Dorina Creangă

ÎNDRUMAR DE LUCRĂRI PRACTICE DE LABORATOR DE RADIOLOGIE

RSITY LIBRARY

Prefaţă

Pentru cei interesaţi de evidenţierea efectelor biologice ale radiaţiilor, acest volum poate oferi câteva repere practice, îndeosebi din sfera radiobiologiei vegetale, dar vizând şi alte materiale biologice (lichide biologice, microorganisme). Astfel, efectele directe ale radiaţiilor emise de surse de activitate mică, pot fi urmărite prin experimente de iradiere a serului sangvin, a seminţelor unor specii de plante ierboase, a organismelor vegetale în stadii ontogenetice timpurii, a unor soluţii coloidale, a microorganismelor, a sucurilor vegetale.

Metodele propuse pentru urmărirea acestor efecte se bazează pe măsurători de tensiune superficială, măsurători spectrofotometrice asupra conţinutului de pigmenţi asimilatori din ţesuturile verzi, evaluări statistice ale lungimii plantulelor, măsurători asupra coeficientului de vâscozitate, asupra indicelui de refracţie, asupra turbidităţii unei suspensii; metode biochimice de evaluare a activităţii enzimatice şi a conţinutului mediu de acizi nucleici sunt, de asemenea, recomandate pentru unele experimente. Lucrările de laborator

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

propuse urmăresc atât efectul expunerii directe la surse slabe de radiații ionizante sau de radiații ultraviolete cât și efectele indirecte generate de administrarea apei radiolizate.

Pentru lucrul cu studenții, iradierile materialelor biologice se pot efectua în laboratoare specializate, astfel ca, după un interval de timp convenabil pentru apariția efectelor biologice, aceste materiale să fie aduse și investigate în cadrul orelor de laborator de radiobiologie.

Studierea efectelor radiațiilor de mică intensitate, comparabile cu variațiile temporare ale fondului natural de radioactivitate atmosferică, reprezintă nu numai un exercițiu de laborator lipsit de orice periculozitate dar și o direcție de investigație de interes ecologic, astfel că cititorii pot găsi în acest volum și surse de inspirație pentru activități de cercetare.

Autoarea rămâne îndatorată celor care pot veni cu sugestii constructive pentru îmbunătățirea acestui material.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

INFLUENȚA RADIAȚIILOR GAMMA DE INTENSITATE MICĂ ASUPRA CREȘTERII PLANTELOR

SCOPUL EXPERIMENTULUI: evidențierea influenței radiațiilor ionizante de tipul radiațiilor γ de la o sursă cu activitate mică asupra plantelor aflate în stadii ontogenetice timpurii. Studierea comparativă a unor parametri fenotipici cantitativi la plante obținute din semințe expuse radiațiilor ionizante γ și plante martor, provenite din semințe neiradiate.

MATERIALE ȘI DISPOZITIVE NECESARE

- Semințe de plante ierboase, cum ar fi *Papaver somniferum* (o specie de mac) sau *Chelidonium majus* (rostopasca). Acestea trebuie să provină din loturi experimentale, cultivate într-un perimetru controlat, astfel ca să reprezinte, pe cât posibil, un material biologic cu genofond uniform.
- Sursă de radiații ionizante pentru uz de laborator (în cazul nostru o sursă de cobalt cu activitatea de circa 10 μCi), pe care se așează, pe rând, flacoanele cu probe. Doza este reglată prin timpul de expunere.
- Cutii Petri de circa 9,5 cm diametru, tapetate cu hârtie de filtru umectată, în care se produce germinarea și creșterea plantulelor.
- Balanța necesară pentru cântărirea semințelor precum și a masei de substanță proaspătă pentru extracția pigmenților trebuie să aibă precizia de cel puțin 0,1 mg.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- Spectrofotometrul de absorbție în vizibil poate fi de tip Specol, Specord UV-VIS, VSU-2P etc., grosimea cuvelor fiind de 1 cm.
- Mojar de porțelan sau de agat cu pistil mic precum și nisip de cuarț neutralizat sau sticlă pisată neutralizată pentru mojararea masei de substanță proaspătă.
- Hârtie de filtru pentru transferul cantitativ al extractelor de pigmenți.
- Acetonă 90% în apă bidistilată pentru extracția pigmenților și determinarea spectrofotometrică.

FENOMENOLOGIE

Clasificarea radiațiilor ionizante se poate face după mai multe criterii: masa, sarcina electrică, originea.

Din punct de vedere al masei de repaus radiațiile ionizante pe care le întâlnim în radiobiologie se clasifică în două categorii mari:

(a) radiații corpusculare, a căror masă de repaus este diferită de zero;

(b) radiații fotonice cu masa de repaus nulă:

(a) radiațiile corpusculare pot fi direct sau indirect ionizante:

radiații alfa

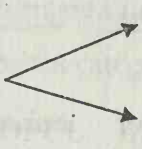
radiații beta (electroni, pozitroni) - radiații direct ionizante

ioni grei

neutroni - *radiații indirect ionizante*

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(b) radiațiile fotonice pot fi:



- radiații indirect ionizante

Radiațiile γ, generate prin tranziții nucleare la nivelul izotopilor radioactivi, cum este bine cunoscutul Co^{60} (care stă și la baza surselor radioactive de laborator indicate pentru această lucrare practică), au, în marea majoritate a cazurilor, energii mai mari (ne referim la energia unui foton, a unei singure cuante) decât radiațiile X, generate în tuburile de tip Coolidge. Radiațiile X, produse prin tranziții la nivelul învelișului electronic profund din atomi cu număr atomic mare, pot să aibă energii foarte mari dacă instalația de producere se bazează pe acceleratori puternici de particule bombardante (acceleratori liniari sau betatroane). În principiu, dacă un foton X și un foton γ au aceeași energie, efectele lor sunt identice.

Radiațiile γ intră în categoria radiațiilor indirect ionizante, ca și neutronii, deoarece nu sunt purtătoare de sarcină electrică și nu pot intra în interacțiuni electrice directe cu învelișul electronic al atomului. Aceste radiații fotonice pot participa la interacțiuni cu următoarele "ținte" atomice:

-electronii atomici:
- împrăștiere elastică - difuzie Rayleigh-Thomson
- împrăștiere inelastică - difuzie Compton
- absorbție - efect fotoelectric

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

-nucleele atomice: → generare de perechi electron-pozitron
→ reacţii fotonucleare

În aplicaţiile biologice şi medicale ale radiaţiilor ionizante electromagnetice (energii de sute de KeV sau de ordinul MeV-ilor) probabilitatea de realizare a reacţiilor fotonucleare este extrem de mică (aceste procese necesită energii mult mai mari) şi chiar şi producerea de perechi electron-pozitron este foarte rară. *Împrăştierea coerentă* este dominată de *efectul fotoelectric* care se produce cu cea mai mare probabilitate la energii mici cum sunt cele utilizate în radiodiagnostic (de exemplu, radiaţii X cu energii de 60-120 KeV) iar *efectul Compton* este principalul fenomen fizic care se produce în radioterapie (de exemplu în cobaltoterapie, unde se utilizează radiaţiile γ cu energii de 0,66 MeV sau 1,33 MeV).

Efectele biologice ale radiaţiilor ionizante reprezintă faza a treia a interacţiunii acestor factori fizici cu organismele vii. Dacă faza interacţiunilor fizice durează doar fracţiuni (10^{-15}-10^{-5}) de secunde (efecte ca efectul fotoelectric, efectul Compton, generarea de perechi electron-pozitron - caracteristice interacţiunii fotonilor X şi γ cu substanţa - producându-se *practic instantaneu*) iar faza interacţiunilor chimice este apreciată la durate variabile între câteva secunde şi câteva zile, în schimb manifestarea efectelor biologice se poate produce la interval de câteva ore până la câteva săptămâni, luni şi chiar ani (efectul tardiv al iradierilor).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Absorbția radiațiilor poate induce efecte biologice la nivel celular cum ar fi influențarea funcțiilor celulare metabolice și a funcțiilor celulare integrate. În prima categorie se disting:

- influențarea sintezei de proteine;
- influențarea sintezei de acizi nucleici.

În a doua categorie se includ:

- modificarea ritmului de creștere;
- întârzierea mitozei;
- moartea celulară întârziată;
- moartea celulară imediată.

Sinteza de proteine este un proces metabolic complex în urma căruia rezultă atât enzimele catalizatoare ale reacțiilor biochimice din celulă cât și substanțele proteice de constituție. Celulele în care se resimt efectele radiațiilor sunt cele care efectiv au absorbit energia unor fotoni și, la nivelul cărora, fenomenele de restaurare a funcțiilor afectate nu au funcționat eficient. *Deci atât iradierea propriu-zisă cât și afectarea celulelor au un caracter statistic.* Toate organismele vii sunt mai sensibile la acțiunea factorilor perturbatori cum sunt radiațiile ionizante, dacă sunt iradiate în stadii ontogenetice timpurii, de embrion sau de organism juvenil.

MODUL DE LUCRU

Prima etapă

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- Se aleg şi se numără sau se cântăresc cantităţi egale de seminţe care să constituie probele şi martorul.
- Probele se expun la radiaţiile γ emise de o sursă cu activitate mică pe durate de timp diferite, astfel ca fiecare probă să primească o doză diferită de radiaţii (de exemplu 30 minute, 2 ore, 8 ore, 48 de ore etc.).
- Probele şi martorul se pun la germinat pe suport de hârtie de filtru umectată în vase Petri cu capac, lăsându-se la întuneric, într-o incintă care să asigure un microclimat constant şi controlabil.

A doua etapă

- După un număr de 7-10 zile (în funcţie şi de specie) probele şi martorul se supun unor teste pentru evaluarea unor parametri fenotipici exprimabili cantitativ cum sunt: puterea de germinare (procentajul de seminţe germinate) - P1, conţinutul de clorofilă *a* (notaţie uzuală: chl *a*) - P2, conţinutul de clorofilă *b* (notaţie uzuală: chl *b*)- P3, total pigmenţi carotenoizi (notaţie uzuală: t.c.)- P4 (prin extracţie acetonică şi dozare spectrofotometrică).
- Pentru evaluarea lui P1 se numără plantulele crescute şi se raportează procentual la numărul iniţial de seminţe puse la germinat.
- Pentru determinarea parametrilor P2, P3, P4 se cântăresc, din fiecare probă, cantităţi de substanţă proaspătă care se mojarează şi se transferă

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

cantitativ în baloane de sticlă cotate cu ajutorul unor cantități convenabile de acetonă 90% (în apă distilată), de exemplu 0,25 g substanță proaspătă la 25 ml solvent (se filtrează prin pâlnie și hârtie de filtru).

- Se determină valorile absorbanței (coeficientului de extincție) ale fiecărei probe și martorului la lungimile de undă de 645 nm, 663 nm, 472 nm.
- Se calculează valorile parametrilor urmăriți cu formulele:

$$\text{chla} = \frac{12{,}3E(663) - 0{,}86E(645)}{d1000w} v \quad (1)$$

$$\text{chlb} = \frac{19{,}3E(645) - 3{,}6E(663)}{d1000w} v \quad (2)$$

$$\text{t.c.} = \frac{E(472)10}{dwb} v \quad (3)$$

În formulele de mai sus $E(\lambda)$ reprezintă valoarea coeficientului de extincție la lungimea de undă λ, d este grosimea cuvei (în cm), w este cantitatea de masă proaspătă (în grame), v este volumul de acetonă 85% (în ml) iar b=2485 este un factor de omogenizare a relațiilor cantitative.

Formulele au fost propuse în urma unor observații sistematice asupra spectrelor electronice de absorbție ale suspensiilor de cloroplaste (organitele celulare care cumulează pigmenții asimilatori de tipul clorofilelor și caroteniozilor), ca și asupra extractelor selective de pigmenți.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Datele numerice obținute se trec într-un tabel de tipul celui de mai jos.

TABEL CU DATELE EXPERIMENTALE

Proba	Durata iradierii	E(663 nm)	E(645 nm)	E(472 nm)	P1 (Chl *a*)	P2 (Chl *b*)	P3 (t.c.)
1							
2							

Lucrarea se va desfăşura pe durata a două şedinţe de laborator, corespunzător celor două etape de lucru de mai sus.

ÎNTREBĂRI

1. Care sunt principalele fenomene fizice de la interacțiunea radiațiilor ionizante electromagnetice de energii mici şi medii cu substanța?
2. Care sunt principalele efecte biologice care se pot induce prin iradiere organismelor vii?
3. Care este conținutul total de pigmenți carotenoizi dintr-o probă de 0,5 g solvită într-un volum de 50 ml solvent acetonic, dacă absorbanța la lungimea de undă de 472 nm este de 0,76 iar grosimea cuvei este de 1 cm ?

Notă. Pentru ca modificările induse de radiații în probe să fie semnificative din punct de vedere statistic, fiecare probă (ca şi martorul) trebuie repetată de câteva ori iar apoi trebuie aplicat testul Student (cu ajutorul programelor MSExcel).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

EFECTELE INDIRECTE ALE RADIAȚIILOR ASUPRA DEZVOLTĂRII GRAMINEELOR

SCOPUL EXPERIMENTULUI

Evidențierea experimentală a efectelor iradierii apei asupra dezvoltării unor specii de graminee tratate cu apă iradiată (radiolizată), în raport cu plantele martor.

MATERIALE ŞI DISPOZITIVE NECESARE

- Cariopside de plante graminee cum ar fi *Triticum aestivum* (grâul comun) sau *Secale cereale* (secara). Acestea trebuie să reprezinte, pe cât posibil, un material biologic cu genofond uniform, deci să provină din loturi experimentale, cultivate într-un perimetru controlat.
- Sursă de laborator (de exemplu o sursă de cobalt cu activitatea de circa 10 μCi) pentru iradierea apei (cantități de circa 100 ml, în pahare Berzelius).
- 2x4 cutii Petri de circa 9,5 cm diametru pline cu pământ de seră (din același ambalaj) în care se produce germinarea cariopsidelor iradiate şi neiradiate (martor).
- Balanța necesară pentru cântărirea masei de substanță proaspătă şi

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

uscată trebuie să aibă precizia de cel puțin 0,1 mg.

- Incinta de uscare a masei proaspete trebuie să asigure temperaturi de 90-105 ^{0}C timp de 24 de ore.
- Opțional, acetonă 90% în apă bidistilată, mojar cu pistil, hârtie de filtru și spectrocolorimetru pentru determinarea pigmenților asimilatori.

FENOMENOLOGIE

Apa este un constituient preponderent în majoritatea țesuturilor vii, animale și vegetale. Acumularea apei în organismele vegetale se derulează pe parcursul tuturor etapelor de dezvoltare a acestor organisme constituind mediul de reacție intracelular pentru toate procesele metabolice. Iradierea oricărui organism înseamnă nu numai expunerea macromoleculeor proteice, a lipidelor și glucidelor la efectele radiațiilor dar și expunerea numeroaselor molecule de apă.

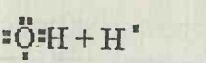
1. Radioliza apei

Radiațiile ionizante care sunt absorbite în apă produc modificări structurale la nivelul unui însemnat procentaj de molecule care suferă procesul de *radioliză*. Forma globală a procesului de radioliză a apei este următoarea:

$$H_2O \rightarrow HO^{\bullet} + H^{\bullet}$$

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

unde oxidrilul (sau hidroxilul) şi atomul de hidrogen liber sunt radicali chimici foarte reactivi, deoarece au număr impar de electroni pe ultimul strat şi prezintă tendinţa de a interacţiona cu alte sisteme atomice pentru a-şi completa acest ultim strat electronic.

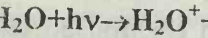


Pentru a explica reacţia globală de radioliză a apei s-au emis mai multe teorii dintre care două sunt edificatoare:

- ipoteza lui Samuel şi Magee;
- ipoteza lui Lea, Gray şi Platzman.

• În prima ipoteză, etapele radiolizei apei sunt următoarele:

-moleculele de apă din imediata apropiere a traiectoriei fluxului de radiaţii ionizante pierd câte un electron:



-electronii eliberaţi sunt în stare energetică superioară şi au viteze relativ mici astfel că sunt repede termalizaţi prin coliziuni cu sistemele atomice din mediul ambiental şi nu ies, practic, din sfera de atracţie a ionilor moleculari de apă ce s-au format lângă traiectoria radiaţiilor ionizante:

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$e^{-}* \rightarrow e^{-}*_{t}$$

-moleculele de apă se refac în forma neutră inițială dar în stare energetică superioară:

$$H_2O^{+}+e^{-}*_{t} \rightarrow H_2O*$$

-aceste molecule de apă, instabile din punct de vedere energetic, se desfac în radicalii liberi caracteristici:

$$H_2O* \rightarrow H^{\bullet} + HO^{\bullet}$$

Ambele specii de radicali rămân la fel de aproape de traiectoria radiațiilor ionizante și de aceea curbele lor de distribuție practic coincid.

• În cea de-a doua ipoteză, etapele radiolizei apei diferă față de cele de mai sus:

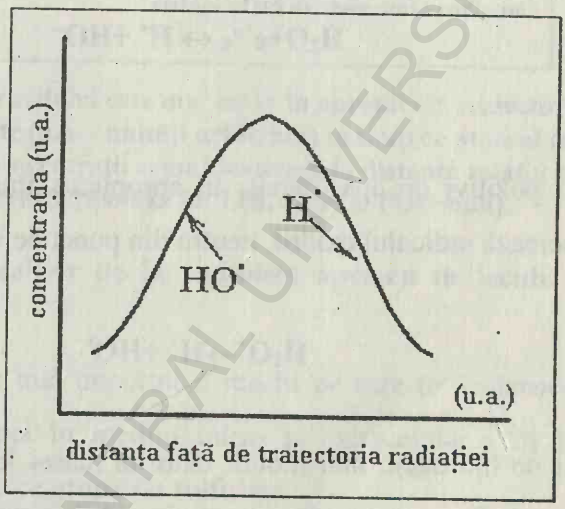
-moleculele de apă care absorb un foton din fluxul de radiații ionizante eliberează câte un electron de viteză relativ mare și cu energie mai mare:

$$H_2O+h\nu \rightarrow H_2O^{+}+e^{-}_{v}*$$

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

-electronii liberi generați au energie cinetică suficientă pentru a părăsi sfera de atracție a ionilor moleculari (pozitivi) de apă ajungând la distanțe de 50-150Å înainte de a fi termalizați:

$$e^-_v * \rightarrow e^-_t *$$



Concentrațiile celor doi radicali de la radioliza apei (u.a. - unități arbitrare) sunt aceleași la orice distanță față de traiectoria fluxului inițial de radiații (ipoteza lui Samuel și Magee)

-electronii termalizați ajung printre molecule de apă neutre la distanțe relativ mari față de direcția fluxului de radiații, unde se află ca într-o groapă de potențial datorită momentelor dipolare ale moleculelor de apă ("electroni hidratați");

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$e^-_t{}^* \rightarrow e^-{}^*_h$$

-un astfel de "electron hidratat" cedează excesul de energie provenită de la fluxul de radiații unei molecule neutre de apă determinând (reversibil) desfacerea acesteia în radicalii oxidril ionizați negativ și hidrogen atomic:

$$H_2O + e^-{}^*_h \leftrightarrow H^\bullet + HO^-$$

-ionii pozitivi de apă, rămași în apropierea traiectoriei inițiale a radiației generează radicalul oxidril, neutru din punct de vedere electric:

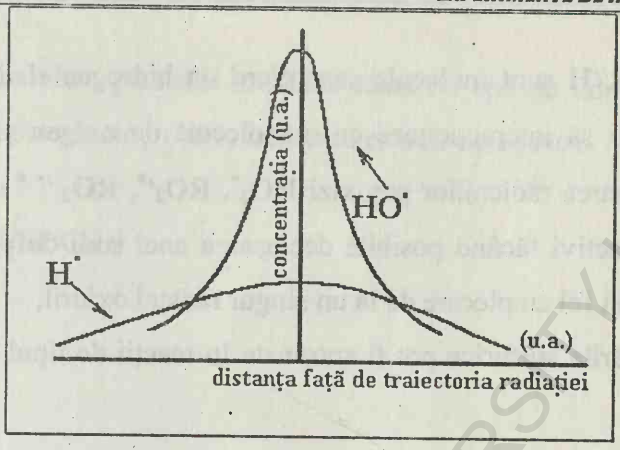
$$H_2O^+ \rightarrow H^+ + HO^\bullet$$

-ionii de hidrogen, mai mobili datorită masei lor mai reduse, pot ajunge în zona de formare a ionilor negativi oxidril pentru a-i neutraliza:

$$H^+ + HO^- \rightarrow H_2O$$

Cele două tipuri de radicali liberi au curbe de distribuție diferite ale concentrației în funcție de distanța până la traiectoria inițială a fluxului de radiații ionizante.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Concentrația hidroxilului este mai mare în apropierea traiectoriei inițiale a radiației ionizante (u.a. - unități arbitrare) în timp ce atomul de hidrogen poate fi găsit în concentrații semnificative și la distanțe relativ mari față de aceasta (ipoteza lui Lea, Gray și Platzman).

2. Reacțiile radicalilor de la radioliza apei cu molecule din mediul celular

Dintre cele mai importante reacții pe care le declanșează radicalii de la radioliza apei în mediul intra- și extracelular sunt formarea de peroxizi și reacțiile cu grupările sulfurate:

-formarea de peroxizi este mult influențată de prezența oxigenului:

$$RH+HO^{\bullet} \rightarrow R^{\bullet}+H_2O$$

$$R^{\bullet}+O_2 \rightarrow RO_2^{\bullet}$$

$$RO_2^{\bullet}+R'H \rightarrow RO_2H+R'^{\bullet}$$

$$R'^{\bullet}+O_2 \rightarrow R'O_2^{\bullet}$$

$$R'O_2^{\bullet}+R''H \rightarrow R'O_2H+R''^{\bullet} \text{ etc.,}$$

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

RH, R' H, R''H sunt molecule care pierd un hidrogen şi devin radicali liberi capabili să interacţioneze cu o moleculă de oxigen şi să conducă astfel la formarea radicalilor peroxizi $RO_2^{\bullet}$, $RO_2'^{\bullet}$, $RO_2''^{\bullet}$ etc. care sunt extrem de reactivi făcând posibilă declaşarea unei serii de până la 70 de reacţii de acest fel cu plecare de la un singur radical oxidril;

-grupările sulfurice pot fi antrenate în reacţii de tipul celor de mai jos:

-constituirea grupărilor disulfurice:

$$2RSH+2HO^{\bullet} \rightarrow RS\text{-}SR+2H_2O$$

-constituirea de grupări disulfurice în prezenţa oxigenului:

$$2RSH+2HO_2^{\bullet} \rightarrow RS\text{-}SR+2H_2O_2$$

Observaţie: grupările disulfurice pot fi desfăcute în grupări sulfurice, simple, sub acţiunea *directă* a radiaţiilor.

Notă: grupările sulfurice sunt prezente în diverse structuri moleculare importante cum sunt aminoacizii sulfuraţi din componenţa multor tipuri de proteine.

Toate aceste reacţii perturbă în mod semnificativ metabolismul celular conducând la alterări ale unor funcţii celulare vitale. În experimentul propus de această lucrare radicalii de la radioliza apei sunt

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

introduşi în celulele plantelor studiate odată cu apa de udare, deci, deşi experimentul este de tip *in vivo*, iradierea este de tip *in vitro*.

MODUL DE LUCRU

Prima etapă

- Se aleg şi se numără cantităţi egale de seminţe (de exemplu câte 100 de seminţe) care să constituie probele şi martorul. Se evită seminţele deteriorate mecanic sau afectate de alţi factori. Se aşează în cutii Petri conţinând un strat de circa 1 cm de pământ de seră, pentru germinare (în condiţii controlate).
- Paharele Berzelius conţinând apă distilată se aşează pe rând pe sursa de radiaţii ionizante, timpul de expunere fiind acelaşi pentru toate probele de apă (de circa 3 ore).
- În 2x4 cutii Petri, unde au fost amplasate câte 100 de seminţe, reprezentând 4 probe şi patru martori, zilnic se vor administra câte 20 ml de apă neiradiată la martori şi câte 20 ml de apă iradiată la probe.
- Până la apariţia primilor vlăstari verzi din stratul de pământ, probele şi martorii se lasă (germinaţia) la întuneric, într-o incintă care să asigure un microclimat constant şi controlabil, apoi se expun la lumină şi căldură (circa 20 ^{0}C).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

A doua etapă

- După un număr de 7-10 zile (în funcție și de specie) probele și martorul se supun unor teste pentru evaluarea unor parametri fenotipici exprimabili cantitativ cum sunt: puterea de germinare (procentajul de semințe germinate) - F1, distribuția lungimilor plantelor F2, masa de substanță proaspătă - F3, masa de substanță uscată - F4, cantitatea de apă acumulată - F5.

Notă: opțional se pot efectua și determinările conținuturilor de pigmenți fotosintetizatori (ca la lucrarea dedicată efectelor directe ale iradierilor)

- Pentru evaluarea lui F1 se numără plantulele crescute și se raportează procentual la numărul inițial de semințe puse la germinat.
- Pentru evaluarea lui F2 se scot plantulele din stratul de pământ (fără a se smulge) și, cu o riglă, se determină lungimea fiecărei plante (în cm).
- Pentru determinarea parametrilor F3, F4, F5 se cântăresc masele de substanță verde din fiecare probă (F3), apoi masele de substanță uscată obținută prin tratamentul termic (F4), apoi diferențele dintre acestea (F5).

Datele numerice obținute se trec într-un tabel de tipul celui de mai jos.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

TABEL CU DATE EXPERIMENTALE

Proba/ martor	Lungimea medie (cm)	Masa verde (mg)	Masa uscată (mg)	Acumularea de apă (mg)
P1				
P2				
P3				
P4				
M1				
M2				
M3				
M4				

Notă: pentru distribuția lungimilor se lucrează cu un tabel suplimentar, curbele de distribuție comparându-se prin intermediul reprezentării grafice box-plot (conform anexei).

Tabel cu parametrii curbelor de distribuție a lungimilor (tehnica box-plot)

Proba	Q_1	Q_3	M	A_1	A_3	excepții

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

INTREBĂRI

1. În ce constă reacția de radioliză a apei și ce reacții pot declanșa radicalii oxidril în mediul celular?
2. Ce se înțelege prin "electron hidratat"?
3. Din tabelul cu date experimentale concluzionați care sunt efectele iradierilor indirecte (prin intermediul apei) asupra parametrului F1; apoi asupra parametrilor F3, F4, F5. Luați în considerare și valorile medii.

ANEXĂ-METODA GRAFICĂ BOX-PLOT

Metoda box-plot constă în reprezentarea unei curbe de distribuție sub forma unei cutii (box) construită pe baza calculării unor parametri statistici ai curbei de distribuție. Este recomandată atât pentru serii mari de date cât și pentru serii puțin numeroase (așa cum este, adesea, cazul în biologie unde nu este ușor să obții date experimentale în număr mare) deoarece, practic, toate punctele din serie apar reprezentate.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cutia este prevăzută cu "aripi" şi puncte extreme care definesc, de fapt, mai multe subintervale de valori în seria de date analizată. Să vedem care sunt parametrii statistici care definesc subintervalele specifice reprezentării box-plot.

Pentru transformarea în box-plot a curbei de distribuţie a valorilor din seria analizată procedăm astfel:

-se împarte intervalul în care sunt cuprinse valorile experimentale într-un număr convenabil de subintervale de dimensiune egală, de exemplu 20 sau 50 de subintervale;

-se numără câte date experimentale revin fiecărui subinterval, ceea ce reprezintă frecvenţa absolută de apariţie a datelor din serie pe subintervalele considerate;

-se reprezintă grafic frecvenţa absolută, f_a, de apariţie a datelor pe subintervalele de valori considerate, sub formă de histogramă;

-se trece la frecvenţele cumulate, f_c, şi se reprezintă grafic;

-se citesc de pe curba frecvenţelor cumulate următorii parametri:

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

A. Capetele cutiei, notate, adică valorile notate Q_1 şi Q_3, valorile ce corespund la frecvenţe cumulative procentuale de 25% şi respectiv 75% (primul şi al treilea quartil); acestea delimitează principalul subinterval al reprezentării box-plot şi anume lungimea cutiei; Acest subinterval conţine circa 50% din datele considerate iniţial.

B. Capetele aripilor cutiei, notate A_1 şi A_3, care sunt date de relaţiile (1) şi (2):

$$Q_1 - 1.5(Q_3 - Q_1) < A_1 < Q_1 \quad (1)$$

$$Q_3 < A_3 < 1.5(Q_3 - Q_1) \quad (2)$$

Se marchează astfel un subinterval care conţine circa 80% din totalul datelor considerate iniţial; evident, acest subinterval îl conţine pe pe primul;

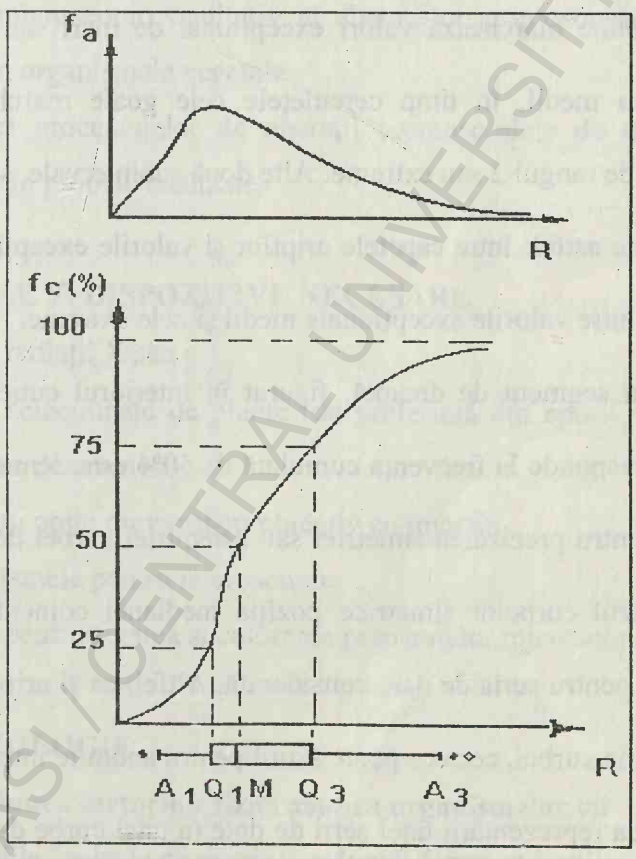
C. Valorile de excepţie, reprezentate prin cerculeţe pline şi respectiv cerculeţe goale, date de relaţiile (3) şi (4):

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$Q_1 - 3(Q_3 - Q_1) < \bullet < A_1 \qquad (3)$$

şi/sau

$$A_3 < \bullet < Q_3 + 3(Q_3 - Q_1) \qquad (3')$$



Reprezentarea box-plot. Curba frecvenţelor absolute şi curba frecvenţelor cumulate. Cu R este notată mărimea (parametrul) evaluată experimental

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\circ < Q_1 - 3(Q_3 - Q_1) \quad (4)$$

şi/sau

$$\circ > Q_3 + 3(Q_3 - Q_1) \quad (4')$$

Cerculeţele pline marchează valori excepţional de mari sau de mici de rangul 1, sau medii, în timp cerculeţele cele goale marchează valori excepţionale de rangul 2 sau extreme. Alte două subintervale, secundare, sunt delimitate astfel: între capetele aripilor şi valorile excepţionale medii şi, respectiv, între valorile excepţionale medii şi cele extreme.

D. Un segment de dreaptă, figurat în interiorul cutiei în dreptul valorii ce corespunde la frecvenţa cumulată de 50% este denumit *mediană* şi este util pentru precizarea simetriei sau asiemtriei curbei de distribuţie. Numai în cazul curbelor simetrice poziţia medianei coincide cu cea a valorii medii pentru seria de date considerată. Altfel, ca şi aripile, ea poate indica asimetria curbei, ceea ce poate fi util pentru anumite interpretări.

Metoda reprezentării unei serii de date (a unei curbe de distribuţie) ca un box-plot este foarte convenabilă pentru compararea unor serii de date provenite din acelaşi sistem sau din sisteme asemănătoare.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

STUDIUL ABERAȚIILOR CROMOSOMIALE INDUSE DE RADIAȚII

SCOPUL EXPERIMENTULUI

- Studiul microscopic cantitativ al aberațiilor cromosomiale induse de radiații în organismele vegetale
- Evaluarea procentajelor de aberații cromosomiale de diferite tipuri existente în probele analizate

MATERIALE ŞI DISPOZITIVE NECESARE

- Sursă de radiații X sau γ
- Semințe selecționate de plante (de preferință din specii cu un număr relativ mic de cromosomi)
- Microscop optic prevăzut cu obiectiv cu imersie
- Lame şi lamele pentru microscopie
- Reactivi pentru fixarea şi colorarea preparatelor microscopice

FENOMENOLOGIE

1. Acțiunea factorilor fizici asupra organismelor vii

Radiațiile ionizate se prezintă atât sub forma radiațiilor corpusculare (electroni, protoni, deutroni, neutroni, helioni, ioni grei,..) cât şi a

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

radiațiilor de natură electromagnetică (fotonii X şi γ) sunt considerate la ora actuală dintre cei mai activi factori fizici care pot influența structurile şi funcțiile organismelor vii. Principalele surse de radiații ionizate sunt: soarele, alte corpuri cereşti (radiația cosmică, în care uneori se includ doar unii mezoni mai energetici decât radiația γ), pământul (datorită depozitelor de materiale radioactive naturale) şi, în ultimele decenii, activitățile umane bazate pe energia nucleară.

Stabilitatea organismelor vii, cele mai complexe sisteme naturale, poate fi afectată de diverşi factori, *chimici, fizici şi biologici*. Cel mai profund nivel de manifestare a acțiunii factorilor fizici este cel celular; avem în vedere aici în special *aberațiile cromosomiale* şi *mutațiile genetice,* ambele efecte fiind etape succesive ale modificărilor nucleului celular. Natura factorilor mutageni nu determină un specific al modificărilor materialului genetic. Între factorii fizici cei mai cunoscuți pentru influența lor asupra organismelor vegetale şi animale se numără *radiațiile ionizante, radiațiile ultraviolete şi variațiile bruşte şi ample de temperatură.*

Diverse studii experimentale efectuate pe culturi de celule (în special celule procariote, mai simple, lipsite de membrană nucleară, aşa cum sunt cele ale bacteriilor şi ale unor alge) au arătat că aberațiile cromosomiale pot fi induse şi de acțiunile altor factori fizici, cum ar fi

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

radiațiile electromagnetice neionizante sau *variațiile de câmp magnetic-uneori foarte slabe.*

2. Etapele acțiunii radiațiilor asupra organismelor vii

Rezultatele diverselor studii cu caracter multidisciplinar au arătat că interacțiunea radiațiilor ionizante cu țesuturi vii se derulează în trei etape principale :

- **etapa I**, constă din coliziunea directă dintre radiații și atomii moleculelor din care sunt constituite substructurile celulare. Principalele efecte care se manifestă sunt: efectul fotoelectric, efectul Compton, efectul de generare de perechi electron – pozitron. Trebuie menționat și că oxigenul și apa liberă intra - sau extracelulară sunt foarte sensibile la acțiunea radiațiilor.
- **etapa II**, constă în acțiuni indirecte ale radiațiilor, modificări ale vitezei de reacție sau noi reacții chimice favorizate de existența unui număr mare de radicali liberi proveniți din radioliza apei și ionizarea oxigenului. Echilibrul electric al hialoplasmei este puternic perturbat prin apariția bruscă a atomilor excitați și a ionilor rezultați din efectele directe ale radiațiilor. Un număr însemnat de molecule cu structuri moleculare se disociază generând noi tipuri de radicali chimici liberi.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Echilibrul electrochimic al celulei se modifică, se declanşează unde de şoc de depolarizare, se modifică concentraţiile de ioni de Na^+, K^+, Cl^- etc., se activează pompele ionice. Concomitent, ionii de oxigen şi radicalii de la radioliza apei produc oxidări, modificări structurale ale biopolimerilor, modificări ale aparatului enzimatic - prin aceasta dereglându-se fundamental legăturile de corelaţie dintre cel puţin trei organite vitale pentru existenţa celulei : mitocondrii, nucleu, nucleoli;

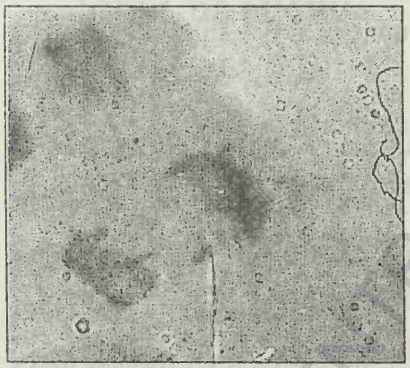
- **etapa III**, caracterizată de efectele biologice evidenţiate la mult timp după încetarea acţiunii acţiunii radiaţiilor (săptămâni, luni şi ani). În principal sunt consecinţe ale unor reacţii chimice între radicalii apăruţi în etapa a doua şi acizii nucleici şi proteinele din interiorul nucleului celular; (de exemplu în celulele sexuale). De asemenea, alterarea de către radicalii chimici eliberaţi în etapa precedentă, a ARN-polimerazei, face ca în lanţul de legătură a nucleotidelor să apară discontinuităţi în timpul replicării lor. Efecte similare se constată şi la cele trei forme de ARN (mesager, de transfer şi ribozomial), deci apar modificări cromosomiale ce imprimă noilor celule caractere anormale transmisibile la urmaşi.

3. Tipuri de aberaţii cromosomiale

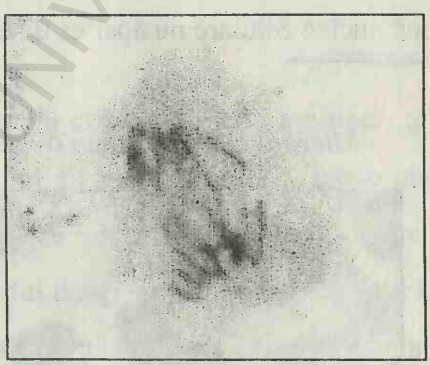
În timpul diviziunii celulare, în componenţa celor două nuclee ale celulelor fiice, se distinge gruparea materialului constituent în nişte firişoare subţiri, aglomerate, care sunt tocmai cromosomii.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

O *diviziune celulară anormală* – marcată de o aberație cromosomială, se prezintă fie sub forma separării în mai mult de două nuclee celulare noi: *trei sau patru nuclee noi* (așa numita anafază tripolară sau quadrupolară,) sau *mai multe fragmente nucleare egale* (micronuclei), fie sub forma unei separări incomplete a celor două nuclee: remanența unor *cromsomi* (cromosomi retardatari) sau a unor *fragmente cromosomiale* în spațiul dintre cele două nuclee sau prezența unor *punți de legătură* care împiedecă separarea definitivă a nucleelor celulelor fiice.



Fragment cromosomial retardat



Punți intercromatidiene

Aberațiile cromosomiale care pot fi observate cel mai bine la microscopul optic sunt: fragmentele cromosomiale, cromosomii întârziați, punțile intercromatidiene și micronucleii.

Fragmentele cromosomiale constau în porțiuni de cromosomi care s-au desprins în urma acțiunii unor cuante energetice absorbite de

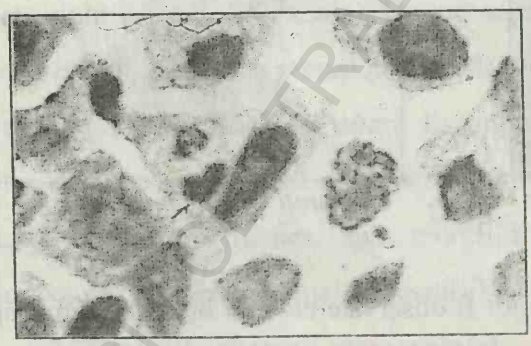
BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

molecula de *ADN* şi care, în celulele fiice, nu vor mai putea transmite informaţia genetică înscrisă pe ele. Ele apar vizibile în spaţiul dintre cele două grupe de cromosomi care vor forma nucleele celor două celule fiice.

Cromosomii întârziaţi se pot observa ca nişte formaţiuni nucleare asemănătoare unei litere Y care se situează în spaţiul dintre cele două grupe de cromosomi destinaţi celor două celule fiice.

Punţile intercromatidiene împiedecă separarea lanţurilor de *ADN* în cele două grupe de cromosomi în timpul diviziunii celulare astfel că cele două nuclee celulare nu apar ca distincte ci unite prin fire subţiri.

Micronucleii presupun divizarea anormală a materialului genetic în trei sau mai multe aglomerări de fragmente cromosomiale, ceea ce înseamnă o perturbare gravă a posibilităţii de transmitere a informaţiei genetice.



Micronuclei

BCU IAŞI CENTRU UNIVERSITAR LIBRARY

Preparatele microscopice permanente pot fi observate direct la microscopul optic de laborator sau, imaginile prinse în câmpul microscopului pot fi fotografiate şi analizate. Din studiul aberaţiilor induse

de radiaţii se pot extrage informaţii calitative – prezenţa aberaţiilor în proba supusă iradierii sau cantitative – procentajul aberaţiilor de un anume tip într-o probă sau procentajele diferitelor tipuri de aberaţii în probe diferite.

MODUL DE LUCRU

- Se aleg 20-30 de seminţe (de exemplu cariopside de graminee - grâu sau secară) şi se supun tratamentului cu radiţii X sau γ. Într-o etapă preliminară experimentului principal se vor testa mai multe durate de iradiere astfel ca, în funcţie de debitul dozei sursei cu care se lucrează, să se poată selecta ordinul de mărime al dozei ce induce un număr semnificativ de aberaţii.

- Se umectează seminţele tratate şi un număr egal de seminţe martor şi se lasă să germineze timp de 24-48 de ore (în funcţie de specie şi de sezonul de vegetaţie).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- Din meristemele de creştere radiculare se prelevă probe de ţesut vegetal (2-3 mm) din care se pregătesc preparate microscopice permanente prin metoda "squash" (strivire şi colorare pe bază de fucsină). Celùlele observate la microscop vor prezenta o colorație intensă roz-trandafiriu, mai ales la nivelul nucleului. Pentru scopul lucrării de laborator de biofizică studenții vor primi lame deja pregătite sub formă de preparate colorate permanente sau lucrarea se va efectua pe parcursul unor şedințe succesive.

- Analiza la microscop se va efectua folosind un microscop optic obişnuit cu un ocular cu mărirea de 10 ori şi obiective cu mărirea de 40 de ori şi 90 de ori (cu imersie în ulei de cedru). Lama cu un preparat biologic va fi prinsă cu clamele de pe masa microscopului şi se va apropia obiectivul până la o distanță suficient de mică pentru a surprinde clar imaginile nucleelor celulare colorate în roz intens.

- Se va deplasa lama pe direcțiile OX şi OY pentru a se putea căuta celule surprinse în diviziune. Facem observația că citoplasma şi membrana celulară apar şi ele colorate într-o nuanță de roz foarte slab, ceea ce uşurează căutarea în câmpul microscopului.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- La nucleele care nu sunt în diviziune nu se observă nici un fel de structurare sau tendință de structurare a materialului genetic în formă de cromosomi. Aceştia apar numai când celula intră în procesul de diviziune.

- Odată surprinsă o celulă în diviziune atenția observatorului va fi îndreptată asupra descrierii imaginii din câmpul microscopului pentru a se putea caracteriza tipul de diviziune: normală sau anormală, iar în cazul diviziunilor anormale pentru a se identifica tipul de aberație cromosomială prezentă.

- Se numără celulele aflate în diviziune (normală sau anormală), atât la martori cât şi la probe. Se tabelează rezultatele de la proba test şi proba martor şi se face o statistică a lor. Se recomandă aplicarea testului t-Student pentru a vedea dacă modifcările induse de radiații, sunt, din punct de vedere cantitativ, cu semnificație statistică sau nu.

- Se vor număra celulele care prezintă aberații cromosomiale din cel puțin 10 câmpuri de observație. Se procedează identic şi cu preparatul martor obținut din semințe neiradiate dar care pot prezenta un număr mic de aberații din cauza acțiunii anterioare a unor factori fizici şi chimici ambientali (necontrolabili).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- Se tabelează rezultatele de la proba test şi proba martor şi se face o statistică a lor. Se recomandă aplicarea testului t-Student pentru a vedea dacă modifcările induse de radiaţii, sunt, din punct de vedere cantitativ, cu semnificaţie statistică sau nu.

TABEL CU REZULTATE EXPERIMENTALE

Aberaţii	Cromosomi întârziaţi (nr.)	Punţi intercromatidiene (nr.)	Micronuclei (nr.)	Fragmente cromosomiale (nr.)
Proba				
Martorul				

ÎNTREBĂRI

1. Care sunt principalele etape ale acţiunii radiaţiilor ionizante asupra ţesturilor vii?
2. Care sunt principalii factori fizici mutageni?
3. Enumeraţi câteva din principalele tipuri de aberaţii cromosomiale.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Notă. Pentru ca modificările induse de radiații în probe să fie semnificative din punct de vedere statistic, fiecare probă (ca şi martorul) trebuie repetată de câteva ori iar apoi se aplică testul Student (cu ajutorul programelor MsExcel).

ANEXA

1. Elemente de genetică celulară. Generalități

Descoperirea efectului mutagen al radiațiilor a contribuit, între altele, la inițierea cercetărilor care au pus bazele unei noi discipline – radiogenetica. Această ramură a ştiințelor naturale a înregistrat în ultimul deceniu un avânt neobişnuit deschizând perspective noi în rezolvarea enigmei vieții, în obținerea unui număr imens de modificări ereditare la cele mai diferite organisme şi în elaborarea şi testarea unor metode de lucru care, în ultimă instanță, prefigurează dirijarea integrală a fenomenului ereditar.

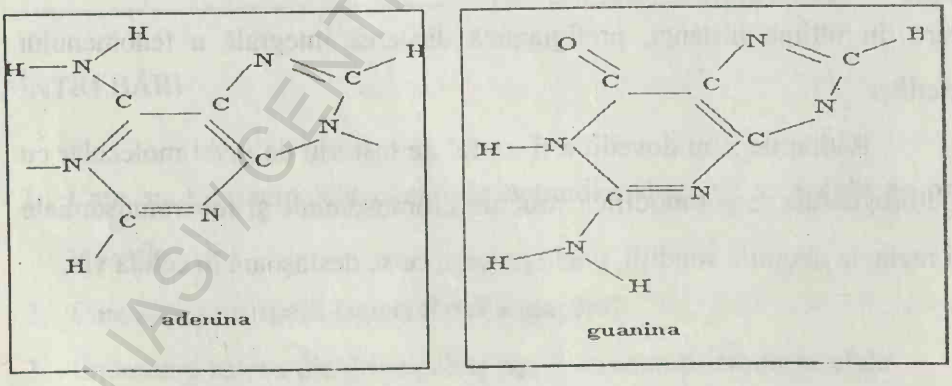
Radiațiile s-au dovedit a fi un fel de bisturiu de nivel molecular cu ajutorul căruia se pot modifica structuri cromosomiale şi subcromosomiale şi regla, în anumite condiții, unele procese ce se desfăşoară în celula vie.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2. Procesele genetice esențiale și structura materialului ereditar

Fenomenul transmiterii caracterelor între generații succesive provenite din același organism a preocupat omenirea încă din cele mai vechi timpuri, dar o cercetare fundamentată științific a acestui proces complex nu a fost înfăptuită decât în ultimele decenii. Încă din anul 1944, Avery, MacLeod și McCarty au arătat că la baza fenomenelor ereditare stau *acizii nucleici*. Capacitatea acestora de replicare asigură continuitatea modelului genetic. La majoritatea organismelor, factorii ereditari (genele)

1. sunt reuniți în *cromosomi,* organite care prin procesele diviziunii mitotice (caracteristică celulelor somatice) și meiotice (caracteristică celulelor sexuale) asigură prezența acestor factori în fiecare celulă. Deși aceste procese de diviziune determină constanța structurală și funcțională a organismului, există totuși posibilitatea modificării materialului genetic și prin urmare a organismului.

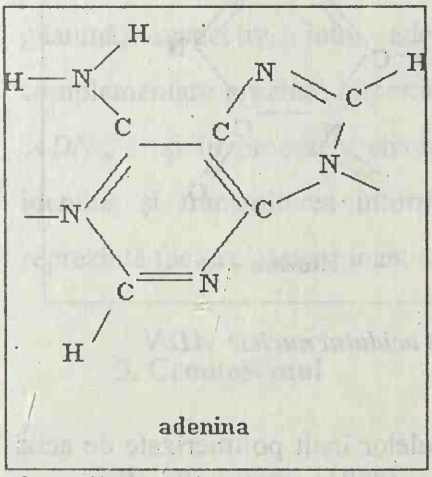


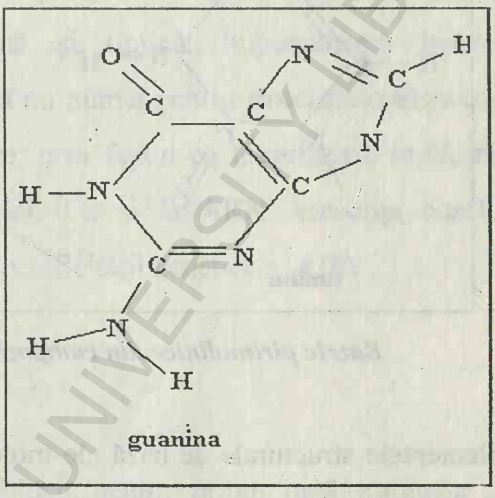
Bazele purinice din compoziția acidului nucleic ADN

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Asemenea modificări se produc prin:

2. mutație, adică prin schimbări în structura, poziția sau numărul



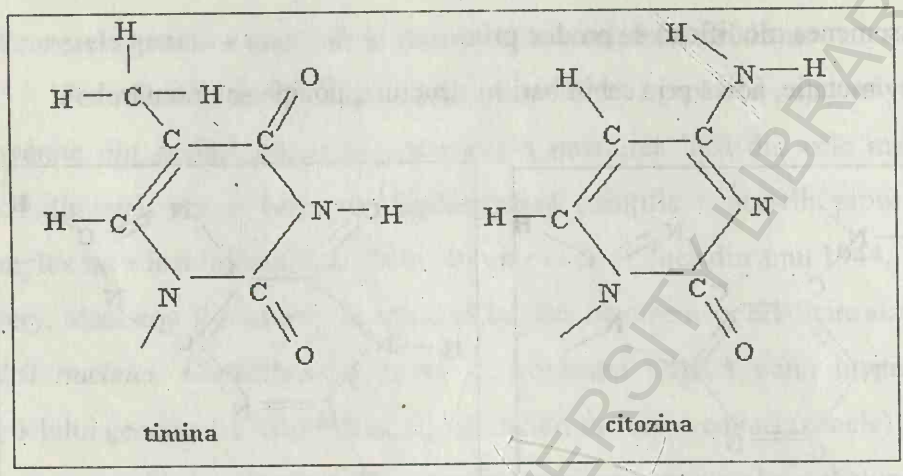


factorilor ereditari.

3. recombinare, care constă în regrupări ale factorilor ereditari.

Acizii nucleici implicați în procesele genetice sunt acidul dezoxiribonucleic – *ADN* și acidul ribonucleic – *ARN*. Din punct de vedere chimic, acizii nucleici sunt molecule polimere constituite din trei componente: acid fosforic, un zaharid (dezoxiriboză – în structura *ADN*, respectiv riboză – în ARN) și baze azotate purinice (adenină și guanină) și pirimidinice (citozină și timină, respectiv uracil).

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Bazele pirimidinice din compoziția acidului nucleic ADN

Elementele structurale de bază ale moleculelor înalt polimerizate de acizi nucleici sunt *nucleotidele*. Hotărâtoare pentru specificitatea genetică este ordinea bazelor în lanțul polinucleotidic.

Acidul ribonucleic (ARN) are funcția de depozitar al informației genetice. Acesta se caracterizează printr-un singur lanț de nucleotide şi are dimensiuni mai mici în comparație cu molecula de *ADN*. În structura moleculelor de ARN intră patru baze azotate, însă în locul timinei din *ADN* apare o altă bază numită uracil. Ca purtător al informației ereditare, o importanță mult mai mare la scara organismelor vii revine acidului dezoxiribonucleic (*ADN*). La majoritatea organismelor, molecula de *ADN* este alcătuită din două lanțuri elicoidale de polinucleotide. Aceste

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

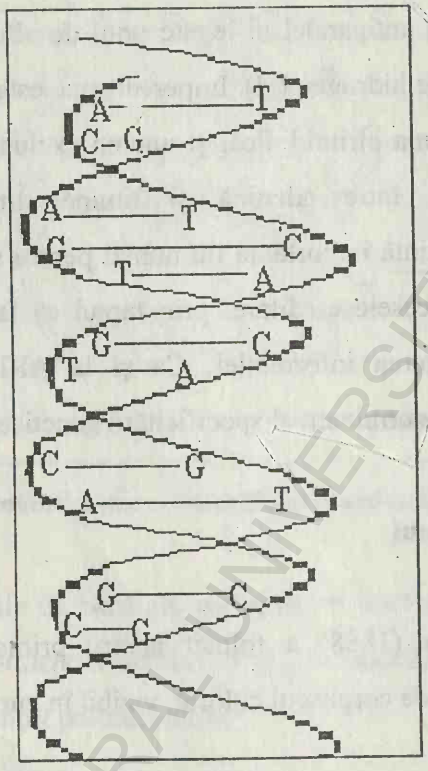
lanțuri sunt dispuse antiparalel și legate unul de altul, la nivelul bazelor azotate, prin punți de hidrogen (H). Împerecherea este posibilă numai între o bază purinică și una pirimidinică, și anume exclusiv între o citozină și guanină, respectiv, între adenină și timină. Împerecherea bazelor complementare prezintă importanță nu numai pentru structura intrinsecă a *ADN*, ci și în procesele ereditare, prin faptul că favorizează replicarea identică și transmiterea informației. Ca și la ARN, secvența bazelor reprezintă factorul determinant al specificității genetice a *ADN*.

3. Cromosomul

W. Waldeyer (1888) a folosit pentru prima oară noțiunea de *cromosom*, în sensul de corpuscul colorat, vizibil în cursul diviziunii

celulare. Odată cu elaborarea teoriei cromosomiale a eredității, în primele decenii ale secolului XX, cunoștințele despre cromosomi se amplifică.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Segment dintr-o moleculă ADN în care bazele complementare de pe cele două lanțuri vecine sunt (A-adenina și T-timina respectiv C-citozina și G-guanina) sunt legate prin interacțiuni slabe (legături de hidrogen) care pot fi rupte în urma energizărilor cauzate de absorbția unor radiații. Notă: pe o spiră a ADN există de regulă 10 perechi de baze!

Astfel se descoperă faptul că ei reprezintă un număr relativ constant pentru

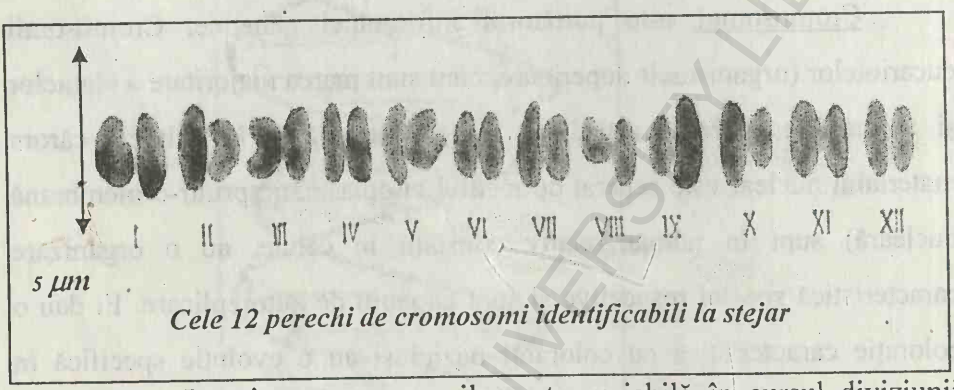
BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

o anumită specie, că prezintă un ciclu cromosomial în care alternează faza haploidă (*n* cromosomi) cu cea diploidă (*2n* cromosomi), că pe un anumit cromosom genele se găsesc dispuse într-o anumită ordine.

Cromosomul este purtătorul informației genetice. Cromosomii eucariotelor (organismele superioare, cum sunt marea majoritate a plantelor și animalelor prezente astăzi pe planeta noastră și în celulele cărora materialul nuclear este separat de mediul citoplasmatic printr-o membrană nucleară) sunt în număr relativ constant în celule, au o organizare caracteristică speciei respective și sunt capabili de autoreplicare. Ei dau o colorație caracteristică cu coloranți bazici și au o evoluție specifică în cursul diviziunii celulare (mitoza – compusă din anafază, telofază, metafază, interfază). La microscop cromosomul eucaritelor apare ca fiind format din două unități funcționale longitudinale identice denumite cromatide, fiecare fiind formată la rândul său din două jumătăți de cromatide. Cele două cromatide sunt unite printr-un centromer. Prin centromer se înțelege o regiune genetică a cromosomului prin care acesta se atașează în mod reversibil de proteinele microtubulilor fusului nuclear, astfel că are loc orientarea și mișcarea sa în timpul diviziunii celulare. Prin spiralizare, în cursul diviziunii celulare cromosomul capătă o formă de transport. prin care el are capacitatea să se dedubleze și să treacă în celulele fiice. În cursul diferitelor faze ale diviziunii celulare au loc

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

modificări importante ale dimensiunii cromosomilor, fenomen datorat capacității variabile de specializare a structurilor longitudinale. Cromosomii sunt alcătuiți din fibre longitudinale subțiri numite



Cele 12 perechi de cromosomi identificabili la stejar

cromoneme. Lungimea cromozomilor este variabilă în cursul diviziunii celulare, ca regulă considerându-se că în profază și respectiv în telofază ei sunt mai lungi și se prezintă sub forma unor fire subțiri greu de individualizat, în timp ce în metafază sunt mult mai scurți și mai groși, putând fi relativ ușor identificați după formă și mărime.

La organismele vegetale cromosomii au dimensiuni care permit să fie observați și studiați cu ajutorul microscopului optic, la măriri de ordinul sutelor de ori. Este necesar ca preparatele microscopice să fie pregătite cu ajutorul unor coloranți adecvați, de regulă pe bază de fucsină (colorant roz violet) aplicați pe țesutul vegetal de forma unui singur strat de celule și tratate cu fixatori (de exemplu butanol).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

TRASAREA CURBEI DE SUPRAVIEȚUIRE IN CAZUL MICROORGANISMELOR EXPUSE LA RADIAȚII

SCOPUL EXPERIMENTULUI

Se urmăreşte punerea în evidență a scăderii densității unei populații de microorganisme sub acțiunea radiațiilor ionizante. Se procedează la determinarea dependenței matematice dintre proporția de supraviețuire a microorganismelor şi doza la care au fost expuse prin intermediul măsurătorilor turbidimetrice.

MATERIALE ŞI DISPOZITIVE NECESARE

- Suspensie stoc de celule de microorganisme dintr-o suşă controlată genetic (preferabil microorganisme nepatogene pentru om, cum este *Saccharomyces cerevisiae*)
- Bec de gaz pentru lucru la flacără, în zonă semisterilă
- Eprubete şi pipete sterilizate termic
- Sursă de radiații gamma
- Spectrocolorimetru sau spectrofotometru pentru determinările turbidimetrice ale densității de celule

FENOMENOLOGIE

După cum este specificat la o altă lucrare practică de radiobiologie, efectele radiațiilor asupra funcțiilor celulare integrate din organismele vii

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

depind de doza de radiații, mergând de la creşterea masei celulare până la moartea celulară imediată.

1. Relații efect - doză

Pentru efectul letal care interesează cel mai mult în cazul aplicațiilor radioterapeutice s-a ales proporția de supraviețuire ca parametru cantitativ de descriere a influenței expunerii la radiații. Denumirea se păstrează şi pentru alte efecte care nu vizează neaparat moartea celulară (inactivarea unor enzime etc.). Prin proporție de supraviețuire se înțelege raportul dintre numărul de celule rămase neafectate de radiații şi numărul inițial de celule.

$$S = \frac{N}{N_0}$$

Experimentele au arătat că odată cu creşterea dozei de radiații, proporția de supraviețuire scade urmând nişte curbe care se pot aproxima cu funcții matematice exponențiale, sigmoidale etc. În cazul microorganismelor, dependența doză-efect este descrisă destul de bine de o funcție exponențială:

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\frac{N}{N_0} = e^{-\frac{D}{D_0}}$$

D_0 fiind parametrul care exprimă radiorezistența - definit ca doza de radiații ce reduce de e ori proporția de supraviețuire:

$$\frac{N}{N_0} = \frac{1}{e} \Rightarrow e^{-\frac{D}{D_0}} = \frac{1}{e} \Rightarrow D = D_0$$

În coordonate semilogaritmice avem o scădere liniară, panta dreptei fiind dată de $\frac{1}{D_0}$:

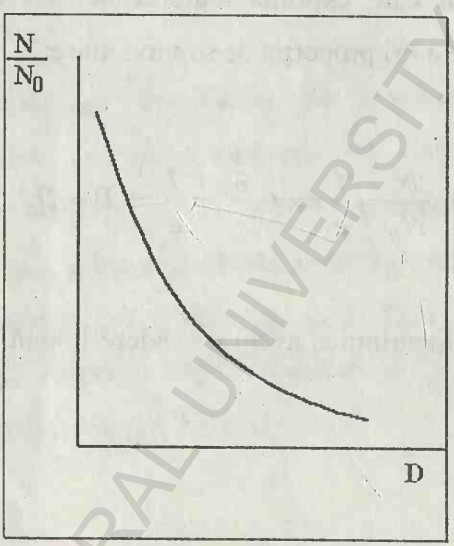
$$ln\frac{N}{N_0} = -\frac{D}{D_0}$$

Pentru a creşte treptat doza de radiații în cazul utilizării unei surse unice, se creşte timpul de expunere, doza cumulată fiind produsul dintre debitul dozei şi timp:

$$D = \frac{\Delta D}{\Delta t}.t$$

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

La inactivarea enzimelor, de asemenea, funcția exponențială este o bună aproximare a curbei experimentale (inactivare ribonuleazei, de exemplu). Pentru descrierea modului de descreştere a numărului de celule mamifere s-a dovedit că o bună aproximare este oferită de curba sigmoidală.

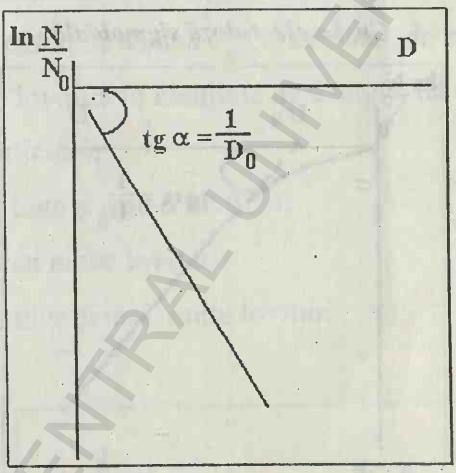


Curba efect-doză de tip exponențial descrie scăderea numărului de celule dintr-o populație de microorganisme iradiată

Curba efect-doză de tip sigmoidal are forma unei litere "S" văzută în oglindă, porțiunea corespunzătoare dozelor mari fiind de fapt, o curbă exponențială. În coordonate semilogaritmice graficul este o curbă cu un umăr în domeniul dozelor mici care se continuă cu o porțiune liniară în domeniul dozelor mari. Panta acestei porțiuni liniare este dată de radiorezistența celulelor iradiate.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

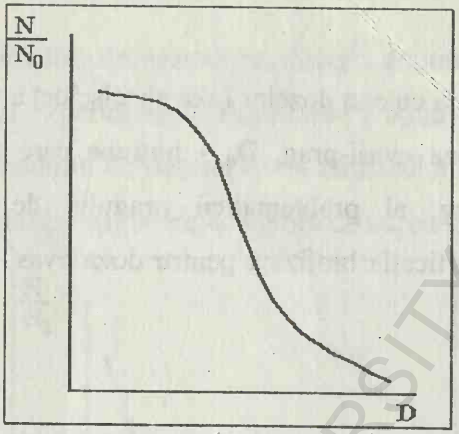
La intersecția cu axa dozelor (axa absciselor) a prelungirii porțiunii liniare, se află doza cvasi-prag, D_q - noțiune care a fost introdusă în contextul mai larg, al problematicii pragului de iradiere. Expresia cantitativă și semnificația biofizică pentru doza cvasi-prag se deduce din anularea lui $\ln\frac{N}{N_0}$.



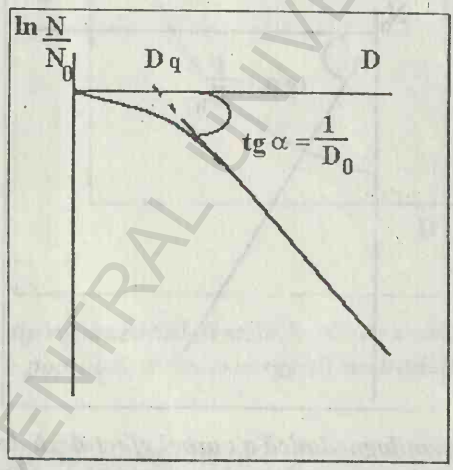
Reprezentarea semilogaritmică a curbei efect-doză de tip exponențial evidențiază scăderea cu atât mai pronunțată cu cât este mai mică radiorezistența, D_0

Relația matematică ce dă dependența de doză a lui $ln\frac{N}{N_0}$ se deduce prin aplicarea teoriei "țintei" la cazul celulelor mamifere. Să prezentăm pe scurt în ce constă teoria "țintei".

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Curba efect-doză sigmoidală



Reprezentarea semilogaritmică a curbei sigmoidale efect-doză

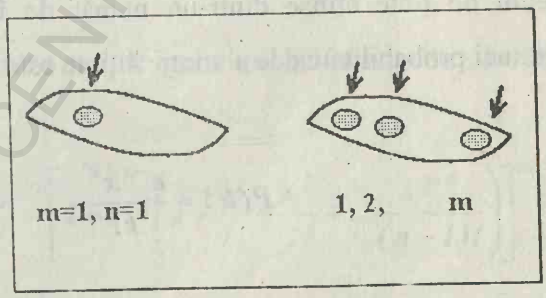
2. Teoria "țintei" şi distribuția Poissson

În conformitate cu această teorie, în fiecare celulă sau moleculă ce suferă acțiunea radiațiilor, există unul sau mai mulți centri de sensibillitate la radiații - una sau mai multe ținte ale radiațiilor.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

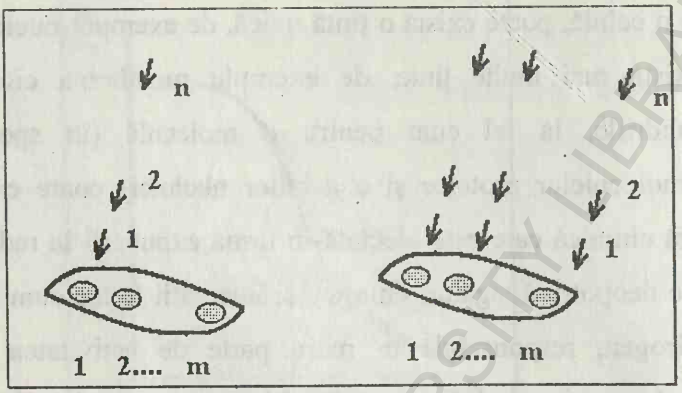
Pentru o celulă, poate exista o țintă unică, de exemplu nucleul celular, dar pot exista mai multe ținte, de exemplu membrana citoplasmatică şi mitocondriile, la fel cum pentru o moleculă (în special în cazul macromoleculelor proteice şi a acizilor nucleici) poate exista o anume legătură chimică care este afectată în urma expunerii la radiații dar pot fi afectate deopotrivă legături chimice şi intercații fizice cum sunt legăturile de hidrogen, responsabile în mare parte de activitatea enzimatică a proteinelor enzimatice. S-au propus câteva modele simplificate, pentru a exprima condiția ca radiațiile să dea efectul scontat, de exemplu:

1. o țintă şi o lovitură (o cantitate de energie, de exemplu cea a unei cuante sau a unei particule);
2. mai multe ținte şi câte o lovitură;
3. o țintă şi mai multe lovituri;
4. mai multe ținte şi mai multe lovituri



Cazurile: 1. O țintă şi o lovitură 2. Mai multe ținte şi câte o lovitură

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Cazurile: 3. O țintă și mai multe lovituri; 4. Mai multe ținte și mai multe lovituri

Trecerea fluxului de radiații printr-un țesut biologic analizat *in vivo* sau printr-o probă biologică preparată *in vitro* presupune lovirea țintelor cu o anumită probabilitate - impactul radiațiilor cu materia având deci, un caracter statistic.

Probabilitatea este dată de distribuția Poisson, astfel că, dacă x este numărul mediu de ținte atinse dintr-un număr de încercări (media pe ansamblu), atunci probabilitatea de a atinge k ținte este $P(k)$:

$$P(k) = \frac{e^{-x} x^k}{k!}$$

Dacă ne situăm în cazul (3), când pentru realizarea efectului radiațiilor este nevoie să se lovească o țintă din fiecare celulă cu câte n lovituri și dacă se

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

administrează un număr mai mic decât *n*, respectiv de *0, 1, 2* sau *n-1* lovituri, atunci efectul nu se produce. Vom spune că avem asigurată proporția de supraviețiure care este egală cu suma probabilităților Poisson corespunzătoare la *0, 1, 2* sau *n-1* lovituri:

$$\frac{N}{N_0} = P(0) + P(1) + P(2) + ... + P(n-1) = e^{-x}\left(1 + \frac{x}{1!} + \frac{x^2}{2!} + ... + \frac{x^{n-1}}{(n-1)!}\right)$$

Diferența până la unitate (certitudine) este probabilitatea de a realiza efectul (de a lovi ținta):

$$P(lov) = 1 - \frac{N}{N_0} = 1 - e^{-x}\left(1 + \frac{x}{1!} + \frac{x^2}{2!} + ... + \frac{x^{n-1}}{(n-1)!}\right)$$

Dacă generalizăm pentru *m* ținte atunci probabilitatea de a lovi țintele este:

$$P(lov)^m = \left[1 - e^{-x}\left(1 + \frac{x}{1!} + \frac{x^2}{2!} + ... \frac{x^{n-1}}{(n-1)!}\right)\right]^m$$

În acest caz proporția de supraviețuire, adică diferența până la certitudine este:

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\frac{N}{N_0} = 1 - P(lov)^m = 1 - \left[1 - e^{-x}\left(1 + \frac{x}{1!} + \frac{x^2}{2!} + \ldots \frac{x^{n-1}}{(n-1)!}\right)\right]^m$$

Pentru cazul 1 - o țintă, o lovitură, avem $m=n=1$ astfel că rezultă:

$$\frac{N}{N_0} = 1 - (1 - e^{-x}) = e^{-x}$$

Recunoaştem tipul de relație efect-doză exponențială, unde $x=D/D_0$.
Pentru cazul 2- mai multe ținte, o lovitură, echivalent cu cazul 3- o țintă, mai multe lovituri, avem $n=1$, $m\neq 1$ astfel că rezultă:

$$\frac{N}{N_0} = 1 - \left(1 - e^{-x}\right)^m$$

Dacă $x=D/D_0$ atunci avem forma cantitativă a relației efect-doză de tip sigmoidal, după cum se verifică şi prin reprezentarea grafică într-un caz numeric concret.

Acum se poate deduce expresia dozei cvasi-prag. Pentru aceasta vom lucra în aproximația dozelor mari. Binomul din expresia proporției de

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

supraviețuire se va dezvolta după formula lui Newton şi se vor alege numai primii termeni, restul fiind neglijați:

$$(a+b)^m = C_m^0 a^m b^0 + C_m^1 a^{m-1} b + C_m^2 a^{m-2} b^2 + ... + C_m^m a^0 b^m$$

$$a = 1, b = e^{-\frac{D}{D_0}}$$

$$\left(1 - e^{-\frac{D}{D_0}}\right)^m \cong 1 - m.e^{-\frac{D}{D_0}}$$

Rezultă că proporția de supraviețuire, pentru doze mari, este dată de:

$$\frac{N}{N_0} \cong 1 - \left(1 - m.e^{-\frac{D}{D_0}}\right) = m.e^{-\frac{D}{D_0}}$$

În reprezentare semilogaritmică, găsirea dozei cvasiprag, Dq, înseamnă identificarea valorii dozei (abscisei) care anulează logaritmul proporției de supraviețuire (ordonata):

$$\ln\frac{N}{N_0} \cong \ln m - \frac{D}{D_0}$$

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$ln\frac{N}{N_0} = 0 \Rightarrow ln.m = \frac{D_q}{D_0} \Rightarrow D_q = D_0\, ln.m$$

Deducerea acestei expresii, arată că, se poate defini o noțiune de *doză cvasiprag*, dar, *doza prag* ... nu există, deoarece este evident că, pentru orice valoare diferită de zero a lui D, N/N_0 este diferit de unitate.

Determinarea experimentală a curbei efect-doză în cazuri concrete (anumite tipuri de culturi de celule, anumite specii de microorganisme) permite evaluarea radiorezistenței (D_0) în domeniul de doze utilizat pentru experiment.

MODUL DE LUCRU

- Se pregăteşte suspensia de celule de microorganisme - drojdia de bere (*Saccharomyces cerevisiae*) şi se repartizează în 6-8 eprubete sterile cu mediu Sabouraud lichid.
- Se determină *densitatea suspensiei* de microorganisme (expresie a *proporției de supraviețuire*) prin măsurarea *turbidității* suspensiei (dată de extincția luminii, în cazul neglijării absorbției) prin măsurători la spectrocolorimetru (pe filtru centrat pe lungime de undă cât mai mică în raport cu dimensiunile celulelor, pentru a evita fenomene de difracție suprapuse peste fenomenul principal, de împrăştiere a luminii, pe care

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

se bazează măsurătoarea turbidimetrică). Se poate lucra, de exemplu, cu lungimea de undă de 520 nm (recomandată).

- Eprubetele cu suspensie de celule se expun la sursa de radiații pentru diferite durate de timp (testate anterior astfel ca, în funcție de debitul dozei ce caracterizează sursa de radiații, să se obțină efecte măsurabile), iar apoi se mențin la termostatul de 24 de grade Celsius timp de 48 de ore.
- După scoaterea din termostat se determină din nou turbiditatea fiecărei probe.
- Se evaluează rapoartele de supraviețuire din rapoartele citirilor turbidimetrice la fiecare probă în raport cu martorul de iradiere. Se tabelează valorile.
- Se reprezintă grafic logaritmul natural din fiecare raport în funcție de doza de radiații (proporțională cu timpul de expunere).
- Din panta porțiunii liniare a curbei semilogaritmice ce descrie relația efect-doză, se determină radiorezistența D_0.

Notă. Pentru ca modificările induse de radiații în probe să fie semnificative din punct de vedere statistic, fiecare probă (ca şi martorul) trebuie repetată de câteva ori iar apoi se aplică testul Student (cu ajutorul programelor MsExcel).

BCU "ASACHI" IAŞI UNIVERSITY LIBRARY

TABEL CU DATE EXPERIMENTALE

Timp de expunere	1 oră	2 ore	4 ore	6 ore	8 ore	10 ore	12 ore
Raportul citirilor turbidității (probă/martor)							
Logaritmul raportului turbidităților							

ÎNTREBĂRI

1. Ce se înțelege prin proporție de supraviețuire?
2. Prezentați pe scurt "teoria țintei".
3. Ce tipuri de relații efect-doză se întâlnesc la organismele superioare? Dar la microorganisme?
4. Ce se înțelege prin doza cvasi prag?
5. Cum se poate determina radiorezistența unei suspensii de microorganisme?
6. Cum se evaluează turbiditatea unei suspensii de microorganisme cu ajutorul unui spectrocolorimetru?

OBSERVAȚIE: Trecerea de la activitatea sursei la doza absorbită se va face cunoscând energia unei cuante γ, timpul de expunere, coeficientul de absorbție în probă și masa probei expuse.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

EFECTUL RADIAȚIILOR GAMMA ASUPRA VÂSCOZITĂȚII UNOR SUSPENSII COLOIDALE

SCOPUL LUCRĂRII

Evidențierea influenței fenomenelor de ionizare asupra vâscozității soluțiilor coloidale.

MATERIALE ŞI DISPOZITIVE NECESARE:

- Vâscozimetru Ostwald
- Sursă de radiații ionizante de mică intensitate
- Soluții macromoleculare proteice
- Cronometru
- Pipete, balanță analitică

FENOMENOLOGIE

1. Vâscozitatea mediilor biologice

Vâscozitatea este o proprietate omniprezentă a mediilor fluide deci şi a lichidelor biologice. Vâscozitatea este considerată rezultatul forțelor de

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

frecare internă generate de interacțiunile de atracție de tip Van der Waals care se opun mișcării relative a moleculelor vecine.

Vâscozitatea soluțiilor macromoleculare variază mult cu concentrația și cu natura componentelor soluției. Ca măsură a vâscozității dinamice se poate utiliza:

- vâscozitatea relativă: $\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0}$

- vâscozitatea specifică: $\eta_s = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0}$

-vâscozitatea intrinsecă: $\eta_i = \lim_{C \to 0} \frac{\eta_s}{C}$

unde η reprezintă coeficientul de vâscozitate iar indicii **r, s, i** corespund la "relativ", "specific" și "intrinsec"; indicele "0" se referă la apă iar C este concentrația macromoleculei studiate în soluție apoasă. Vâscozitatea intrinsecă este o caracteristică a speciei moleculare solvite și nu depinde decât de dimensiunile și forma macromoleculei într-un solvent dat. Einstein, în 1910, a găsit următoarea relație fundamentală:

$$\lim_{\varphi \to 0} \frac{\eta_s}{\varphi} = k$$

unde φ este volumul ocupat de particule dintr-o unitate de volum de soluție (volumul relativ) iar **k** este o constantă ce depinde numai de forma

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

moleculelor: pentru molecule sferice **k** este egal cu 2,5 iar pentru alte forme geometrice **k** este mai mare decât 2,5. Relația este valabilă în ipotezele următoare:

- moleculele sunt rigide şi de dimensiuni mari în comparație cu moleculele de solvent;
- particulele sunt independente unele de altele (ceea ce se verifică când volumul relativ al moleculelor este foarte mic, practic neglijabil).

Legătura dintre volumul relativ şi masa molară şi volumul particulelor în suspensie este dată de:

$$\varphi = \frac{\frac{C}{M}V}{V_0} = \frac{C}{M}V$$

dacă, prin definiție, V_0=1 (unitatea de volum), M fiind masa molară iar V volumul molar. Ținând cont şi de definiția densității rezultă că:

$$\varphi = \frac{C}{\rho}$$

şi, de asemenea:

$$\frac{\eta_s}{C} = \frac{k}{\rho} \rightarrow \eta_i$$

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Graficul vâscozității intrinseci ca funcție de concentrație este o dreaptă paralelă cu axa concentrațiilor dacă avem de-a face cu suspensii microscopice de particule rigide: de exemplu sfere de sticlă sau elipsoizi de plastic în apă. Apare foarte clar că nu avem nici o dependență de dimensiunile moleculelor.

În cazul suspensiilor de macromolecule (de exemplu polimeri) apar abateri de la relația lui Einstein:

- vâscozitatea intrinsecă creşte cu creşterea concentrației;

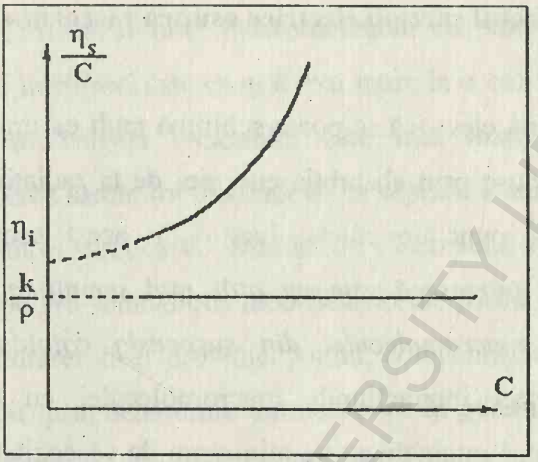
- vâscozitatea intrinsecă poate să depindă de dimensiunile moleculei, deci de greutatea moleculară a polimerului.

Macromolecule rigide. În cazul coloizilor liofobi şi a macromoleculelor nehidratate relația lui Einstein se aplică bine, iar valoarea obținută pentru **k** permite să se facă unele considerații relativ la forma particulelor sau macromoleculelor. Este, de exemplu, cazul colagenului, pentru care se găseşte k=1660, ceea ce corespunde unui elipsoid la care raportul semiaxelor este a/b=175.

Totuşi se observă că vâscozitatea intrinsecă creşte cu concentrația când:

- interacțiunile dintre particule au o importanță considerabilă; se poate ajunge chiar la o fază de gel, prin creşterea rapidă a vâscozității intrinseci cu concentrația în cazul unor macromolecule;

BCU IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Dependența vâscozității intrinseci de concentrație

-volumul macromoleculelor în suspensie nu este acelaşi ca în cazul macromoleculelor în stare uscată, deoarece solvatarea se produce nu numai la nivelul suprafeței macromoleculei ci şi al interiorului său;

Macromolecule flexibile. Sunt macromoleculele de forme bine definite, de exemplu acizii nucleici, proteinele denaturate şi mulți dintre polimerii sintetici în solvenți organici. Pentru acestea vâscozitatea intrinsecă depinde de masa molară prin relația:

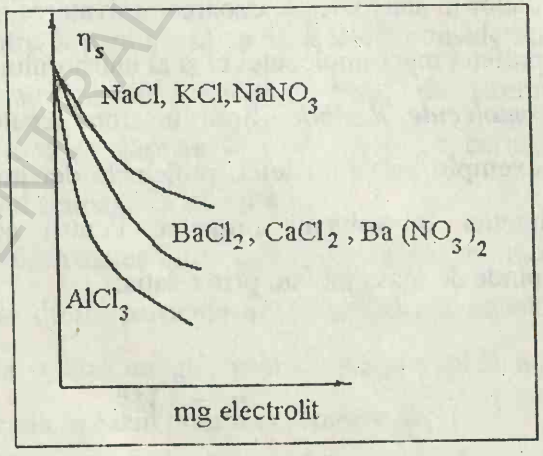
$$\eta_i = kM^{\alpha}$$

Coeficientul α variază între 0,5 şi 1,5 dând unele informații despre interacțiunile dintre diferitele părți ale lanțului polimeric, despre gradul de pliere al acestuia.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2. Efectul sarcinii electrice asupra vâscozității

Sarcina electrică se poate schimba mult ca urmare a proceselor de ionizare produse prin absorbția energiei de la radiații şi, ca urmare, este important să punctăm câteva lucruri în acest sens. Se apreciază că *vâscozitatea intrinsecă este cu atât mai semnificativă cu cât sarcina electrică a macromoleculei din suspensia coloidală este mai mare* deoarece astfel interacțiunile macromoleculei cu alți ioni sunt mai semnificative. Proteinele au un minimum de vâscozitate în soluții aflate la pH-ul izoelectric. În general scăderea vâscozității la adăugare de electrolit în soluția macromoleculară este cunoscută sub numele de efect electro-vâscos.



Efectul electro-vâscos

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

De exemplu, în cazul unei macromolecule cu sarcină negativă, scăderea vâscozității intrinseci este cu atât mai mare la o concentrație dată de electrolit, cu cât valența cationului este mai mare. Electrolitul acționează prin scăderea sarcinilor electrice de la suprafața macromoleculei și deci a potențialului electrocinetic. Măsurarea vâscozității intrinseci este o metodă sensibilă pentru semnalarea modificărilor de formă care apar, de exemplu, prin denaturarea unei proteine. Astfel, colagenul care are forma unui bastonaș alungit, prin denaturare termică trece în gelatină care este o sferă - un ghem statistic, iar vâscozitatea intrinsecă scade de la 115 la 3,5 g/l. În tabelul de mai jos sunt date vâscozitățile intrinseci ale câtorva proteine (după Grémy și Leterrier, 1976).

Tabel cu coeficienți de vâscozitate la câteva macromolecule

Macromolecula	Masa moleculară	Coeficienți de difuzie ($cm^2/s.10^7$)	Vâscozitate intrinsecă (cm^3/g)
Serum albumină umană	66 500	5,94	3,9
Hemoglobina	68 000	6,9	
Fibrinogenul	330 000	2,02	25
Miozina	493 000	1,16	217
Virusul mozaicului tabacului	40 000 000	0,73	36,7

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3. Coloizi hidrofili şi coloizi hidrofobi; coloizi lipofili şi coloizi lipofobi.

În una din primele clasificări ale amestecurilor fluide, aparţinând lui Graham (sec. XIX), dimensiunea particulelor solide dispersate este criteriul principal după care distingem o suspensie de o soluţie micromoleculară şi de o soluţie (suspensie) coloidală macromoleculară:

Suspensie	Soluţie micromoleculară	Soluţie coloidală macromoleculară
Dimensiuni>1.000 Å	<10 Å	10 Å-1000Å
Nr. de atomi>10^9	<1000	10^3-10^9

Cu toate acestea, astăzi se admite că multe tipuri de molecule cu masă moleculară mare şi foarte mare (10^4-10^6) intră în categoria soluţiilor macromoleculare coloidale (de exemplu proteinele şi acizii nucleici). Soluţiile macromoleculare posedă proprietăţile generale ale soluţiilor coloidale dar sunt caracterizate şi prin faptul că macromoleculele dizolvate se pot afla independent una de alta ca în cazul soluţiilor micromoleculare. În sens mai larg, colozii se pot obţine prin dispersia fazei solide în medii aflate în oricare stare de agregare, dar întotdeauna sistemele coloidale sunt caracterizate prin suprafeţele foarte mari de contact dintre faza solidă şi mediul dispersant (de exemplu, când dispersantul este un gaz avem de-a face cu un aerosol, iar când dispersantul este un solid avem de-a face cu un aliaj).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Coloizii la care mediul dispersant este un lichid se consideră soluție coloidală.

Coloizii liofobi au o afinitate mică pentru solventul în care este dispersată faza solidă; dacă solventul este apa atunci coloizii se numesc hidrofobi. Aceşti coloizi sunt, în general, instabili (cauciucul, latexul) fiind suspensii de particule solide insolubile în mediul lichid de dispersie.

Coloizii liofili au afinitate mare pentru mediul de dispersie, moleculele dispersate fiind solubile şi sistemul fiind relativ stabil. Se formează plecând de la asocierea compuşilor macromoleculari. De exemplu, prin încălzirea colagenului (proteină din constituția țesutului conjunctiv al tendonului, ligamentului, cartilajului şi pereților vaselor sangvine) se obține gelatina - forma denaturată a colagenului. Această proteină nu este individualizată în soluție decât în mică proporție; majoritatea moleculelor de gelatină se asociază între ele mai ales prin legături de hidrogen, formând o rețea extinsă în toate direcțiile spațiului în ochiurie căreia sunt prinse moleculele de solvent - se formează un gel.

Coloizii amfiliofili sau micelari sunt generați de prezența simultană, în structura lor, a unei grupări atomice liofile şi a uneia liofobe. În cazul când solventul este apa particulele dispersate se solvă numai parțial şi se organizează astfel încât polii hidrofobi se asociază între ei iar polii hidrofili sunt lăsați în contact cu apa. Se formează micelii care pot fi sferice, dublu stratificate, hexagonale.

BCU "ASTRA" UNIVERSITY LIBRARY

- *Soluții și geluri*

Dacă o soluție apoasă de gelatină este la o temperatură de circa 50 grade Celsius, atunci putem considera că este în stare lichidă, moleculele de gelatină nefiind total independente una de alta.

Un coloid în stare lichidă este denumit și *sol*. Prin răcire, numărul legăturilor de hidrogen dintre moleculele de gelatină crește și formează o rețea, cu o anumită rigiditate, care cuprinde în ochiurile sale moleculele de apă. Până la 90% din moleculele de apă pot fi prinse în această structură de *gel* care permite migrarea unor molecule sau ioni mici la fel de ușor ca într-un lichid liber.

În cazul unui coloid liofil solventul se poate găsi fie în stare liberă, moleculele putându-se deplasa liber față de coloid, fie în stare legată, când moleculele sunt fixate prin solvatare pe particulele coloidale formând în jurul lui un înveliș mai mult sau mai puțin rigid.

Tabel cu punctul izoelectric la câteva proteine (C. Nicolau, Z. Simon, 1968)

Proteina	pH-ul izoelectric	Proteina	pH-ul izoelectric
Hemoglobină (cal)	6,9	citocrom	10,6
Mioglobină (cal)	7.00	fibrinogen	5,50
Miozină	5,40	serumalbumine	4,80
Serumglobine	6,4-7,2	insulină	5,40
Pepsină	1.0	histonă	8,50

În cazul soluțiilor coloidale apoase, moleculele de apă se ataşează în special pe grupările polare ale particulei coloidale şi în jurul radicalilor ionizați. ***Modificând gradul de ionizare (prin expunere la radiații ionizante sau prin modificarea pH-ului) se poate modifica gradul de solvatare, deci şi vâscozitatea soluției coloidale.***

Încărcarea electrică este una din cele două proprietăți definitorii ale soluțiilor coloidale, alături de suprafața mare de contact între cele două faze.

Se admite că există două modalități de încărcare electrică a particulelor coloidale. Încărcarea poate rezulta prin *adsorbția unor ioni* preexistenți în faza lichidă care aderă la suprafața particulelor din faza solidă - este, cel mai adesea, cazul coloizilor liofobi. Încărcarea electrică a suprafeței particulelor coloidale poate rezulta ca urmare a *disocierii sau ionizării unor grupări atomice* aflate la suprafața acestor particule. Se întâlneşte şi la coloizi liofobi şi la coloizi liofili. În ambele cazuri încărcarea poate fi negativă sau pozitivă. Macromoleculele sunt polimeri cu numeroase grupări ionizabile - sunt polielectroliți.

Acizii nucleici posedă o grupare acidă disociabilă, acidul fosforic al fiecărei nucleotide, deci, în soluție, se încarcă negativ (de la gruparea fosfat).

Proteinele au în structura lor resturi de aminoacizi care sunt ionizabili. Resturile de acid aspartic sau acid glutamic sunt acide (se încarcă negativ) în timp ce resturile de histidină, lizină, arginină sunt

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

aminice (se încarcă pozitiv). Aceste grupe se ionizează diferit în funcție de pH. Pentru fiecare proteină există o valoare a pH-ului pentru care numărul sarcinilor pozitive este egal cu cel al sarcinilor negative - pH-ul izoelectric.

Dacă pH-ul solventului este mai mare decât pH-ul izoelectric atunci disocierea funcțiunilor acide este dominantă şi încărcarea rezultantă este negativă.

Dacă pH-ul solventului este mai mic decât pH-ul izoelectric atunci disocierea funcțiunilor aminice este dominantă şi încărcarea rezultantă este pozitivă.

MODUL DE LUCRU

- Se determină coeficientul de vâscozitate al unei soluții coloidale de gelatină, de concentrație convenabilă, cu ajutorul unui vâscozimetru de tip Ostwald, în raport cu apa.
- Se determină densitatea soluției coloidale.
- Se iradiază volume egale din soluția coloidală prin expunerea pe durate diferite de timp la o sursă de radiații ionizante (de exemplu o sursă de Cobalt de intensitate mică).
- Se determină densitatea pentru fiecare probă după iradiere.
- Se determină coeficientul de vâscozitate pentru fiecare probă şi se tabelează rezultatele.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- Se reprezintă grafic coeficientul de vâscozitate în funcție de timpul de expunere.

TABEL CU DATE EXPERIMENTALE

Proba	densitatea	Timpul de curgere	Timpul de expunere	Coeficientul de vâscozitate
Martor				
P1				
P2				
P3				

Notă. Pentru ca modificările induse de radiații în probe să fie semnificative din punct de vedere statistic, fiecare probă (ca și martorul) trebuie repetată de câteva ori iar apoi se aplică testul Student (cu ajutorul programelor MsExcel).

ÎNTREBĂRI

1. La ce se referă relația lui Einstein. Ce abateri apar?
2. Ce este un sol? Dar un gel? Dar o soluție coloidală?
3. Ce efecte pot avea radiațiile ionizante asupra vâscozității unei soluții coloidale?
4. Cum se realizează încărcarea electrică a particulelor coloidale?

BCUIASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5. Ce se înțelege prin pH izoelectric?

6. Ce metode de determinare a vâscozității se pot utiliza ?

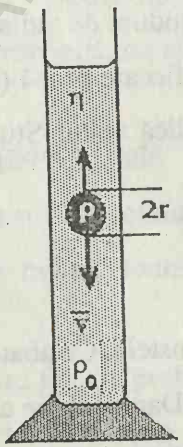
ANEXĂ

Măsurarea vâscozității

- Principiul de funcționare al *vâscozimetrului Hoopler* se bazează pe legea lui Stokes, referitoare la deplasarea unei sfere printr-un fluid vâscos.

$$f = 6\pi\eta rv$$

unde **f** este forța de frecare datorată vâscozității, **r** este raza sferei, **v** este viteza ei iar η este coeficientul de vâscozitate.



Dacă se atinge echilibrul dinamic atunci forța de frecare este echilibrată de greutatea aparentă (diferența dintre greutate și forța arhimedică):

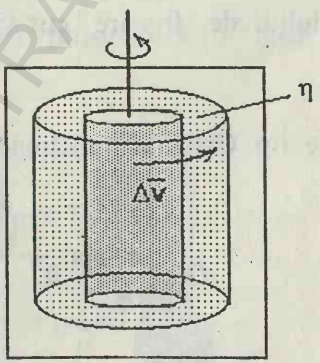
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\frac{4}{3}\pi r^3(\rho-\rho_0)g = 6\pi\eta r v$$

Prin măsurarea timpilor de cădere a aceleiaşi sfere prin lichidul cercetat şi printr-un lichid de referinţă, se poate deduce coeficientul de vâscozitate al lichidului necunoscut:

$$\frac{t}{t_{ref}} = \frac{\eta(\rho_{ref}-\rho_0)}{\eta_{ref}(\rho-\rho_0)} \Leftrightarrow \eta = \eta_{ref}\frac{t}{t_{ref}}\frac{(\rho-\rho_0)}{(\rho_{ref}-\rho_0)}$$

- Principiul cilindrului turnant funcţionează în baza relaţiei de definiţie a



forţei de vâscozitate dintre două straturi de lichid de suprafaţă ΔS între care există un gradient de viteză $\Delta v / \Delta t$:

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\Delta f = \eta \Delta S \frac{\Delta v}{\Delta t}$$

Un recipient cilindric cu fluid este antrenat într-o mişcare de rotaţie uniformă în jurul altui cilindru plin, perfect coaxial cu primul, suspendat de un fir de torsiune. Sub acţiunea cuplului forţelor de vâscozitate cilindrul mobil ia o nouă poziţie de echilibru. Unghiul de rotaţie ce se poate măsura printr-un procedeu optic, este proporţional cu coeficientul de vâscozitate al mediului lichid. Metoda permite variaţia vitezei de rotaţie a cilindrului extern şi determinarea coeficientului de vâscozitate de fiecare dată; dacă acest coeficient nu depinde de viteză atunci se verifică faptul că lichidul studiat este un lichid newtonian. Dacă, din contră, se înregistrează o variaţie a coeficientului de frecare cu viteza atunci lichidul este nenewtonian.

- Vâscozimetrele de tip Ostwald funcţionează pe principiul legii lui Poisseuille:

$$D = \frac{\pi}{8\eta} \frac{\Delta p}{L} R^4$$

unde D este debitul de curgere, L este lungimea tubului, Δ p este diferenţa dintre presiunile la intrarea şi la ieşirea din tub iar R este raza tubului. Măsurătoarea se efectuează prin comparaţie cu un fluid de referinţă. Se

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

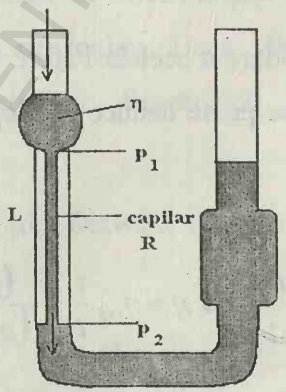
determină timpii de curgere pentru volume egale din cele două lichide astfel că:

$$\frac{D}{D_0}=\frac{t_0}{t}=\frac{\eta_0}{\eta}\frac{\Delta p}{\Delta p_0}$$

Cele două diferențe de presiune se identifică cu presiunile motrice din fiecare caz, respectiv greutățile pe unitatea de masă (densitățile):

$$\frac{t_0}{t}=\frac{\eta_0}{\eta}\frac{p}{p_0}=\frac{\eta_0}{\eta}\frac{\rho}{\rho_0}\Leftrightarrow\eta=\eta_0\frac{t}{t_0}\frac{\rho}{\rho_0}$$

Apa se va lua ca lichid de referință știind că la 20 de grade Celsius are un coeficient de vâscozitate de 10^{-2} poise adică 10^{-3} Nsm^{-2}.



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Măsurarea vâscozității

- Principiul de funcționare al *vâscozimetrului Hoopler* se bazează pe legea lui Stokes, referitoare la deplasarea unei sfere printr-un fluid vâscos.

$$f = 6\pi\eta rv$$

unde **f** este forța de frecare datorată vâscozității, **r** este raza sferei, **v** este viteza ei iar η este coeficientul de vâscozitate. Dacă se atinge echilibrul dinamic atunci forța de frecare este echilibrată de greutatea aparentă (diferența dintre greutate și forța arhimedică):

$$\frac{4}{3}\pi r^3(\rho - \rho_0)g = 6\pi\eta rv$$

Prin măsurarea timpilor de cădere a aceleiași sfere prin lichidul cercetat și printr-un lichid de referință, se poate deduce coeficientul de vâscozitate al lichidului necunoscut:

$$\frac{t}{t_{ref}} = \frac{\eta(\rho_{ref} - \rho_0)}{\eta_{ref}(\rho - \rho_0)} \Leftrightarrow \eta = \eta_{ref}\frac{t}{t_{ref}}\frac{(\rho - \rho_0)}{(\rho_{ref} - \rho_0)}$$

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- Principiul cilindrului turnant funcționează în baza relației de definiție a forței de vâscozitate dintre două straturi de lichid de suprafață ΔS între care există un gradient de viteză $\Delta v / \Delta t$:

$$\Delta f = \eta \Delta S \frac{\Delta v}{\Delta t}$$

Un recipient cilindric cu fluid este antrenat într-o mişcare de rotație uniformă în jurul altui cilindru plin, perfect coaxial cu primul, suspendat de un fir de torsiune. Sub acțiunea cuplului forțelor de vâscozitate cilindrul mobil ia o nouă poziție de echilibru. Unghiul de rotație ce se poate măsura printr-un procedeu optic, este proporțional cu coeficientul de vâscozitate al mediului lichid. Metoda permite variația vitezei de rotație a cilindrului extern şi determinarea coeficientului de vâscozitate de fiecare dată; dacă acest coeficient nu depinde de viteză atunci se vertifică faptul că lichidul studiat este un lichid newtonian. Dacă, din contră, se înregistrează o variație a coeficientului de frecare cu viteza atunci lichidul este nenewtonian.

- Vâscozimetrele de tip Ostwald funcționează pe principiul legii lui Poisseulle:

$$D = \frac{\pi}{8\eta} \frac{\Delta p}{L} R^4$$

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

unde **D** este debitul de curgere, **L** este lungimea tubului, Δp este diferența dintre presiunile la intrarea şi la ieşirea din tub iar **R** este raza tubului. Măsurătoarea se efectuează prin comparație cu un fluid de referință. Se determină timpii de curgere pentru volume egale din cele două lichide astfel că:

$$\frac{D}{D_0} = \frac{t_0}{t} = \frac{\eta_0}{\eta}\frac{\Delta p}{\Delta p_0}$$

Cele două diferențe de presiune se identifică cu presiunile motrice din fiecare caz, respectiv greutățile pe unitatea de masă (densitățile):

$$\frac{t_0}{t} = \frac{\eta_0}{\eta}\frac{p}{p_0} = \frac{\eta_0}{\eta}\frac{\rho}{\rho_0} \Leftrightarrow \eta = \eta_0 \frac{t}{t_0}\frac{\rho}{\rho_0}$$

Oricare dintre aceste metode, care se alege pentru studierea efectului radiațiilor asupra vâscozității soluțiilor coloidale, se va utiliza atât pentru soluția neiradiată cât şi pentru cea iradiată, *în aceleaşi condiții de temperatură*. Apa se va lua ca lichid de referință ştiind că la 20 de grade Celsius are un coeficient de vâscozitate de 10^{-2} poise adică 10^{-3} Nsm^{-2}.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

STUDIUL EFECTELOR GENERATE DE EXCITĂRILE ŞI IONIZĂRILE DE LA INTERACŢIUNEA UNEI DESCĂRCĂRI ELECTRICE CU PROBE VII ŞI INERTE

SCOPUL EXPERIMENTULUI

Acest studiu se poate realiza în cadrul a două lucrări practice de laborator.

1. Cea dintâi este focalizată pe studiul calitativ al imaginilor (înregistrate fotografic) care rezultă din interacţiunea unei descărcări electrice de tip Corona cu probe biologice şi inerte -evidenţierea "aurei" corpurilor de mici dimensiuni.

2. A doua lucrare urmăreşte influenţa pe care o au fluxurile de ioni, electroni şi fotoni din descărcările electrice de tip Corona asupra plantulelor de graminee sau papaveracee, la nivelul unor parametri exprimabile cantitativ cum sunt lungimea, masa verde, conţinuturile de pigmenţi asimilatori.

1. STUDIUL IMAGINILOR ELECTRONOGRAFICE, CU APLICAŢII MEDICALE

MATERIALE ŞI DISPOZITIVE NECESARE

- Dispozitiv generator de descărcări în gaze în atmosferă normală (electronograf)

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- Hârtie fotografică
- Reactivi de developare
- Probe biologice (frunză, plantă întreagă etc.) şi probe inerte (cheie, monedă etc.).
- Cameră obscură

FENOMENOLOGIE

1. Scurt istoric

Studiul fenomenelor electrice pe baze experimentale s-a dezvoltat începând din secolul al XVI-lea; primul electroscop a fost construit de Wiliam Gilbert (1540-1606) iar prima maşină electrostatică de către Otto Guericke (1602-1686) şi Hauksbee (1661-1713), parametrii funcţionali ai acesteia din urma fiind destul de apropiaţi de cei care, câteva secole mai târziu, au fost utilizaţi pentru evidenţierea fenomenelor bioelectrografice. În secolul al XVIII-lea, cu ajutorul buteliei de Leyda, construită de E.G. von Kleist (1700-1784), şi P. von Muschebroch (1692-1761) s-au desfăşurat experienţe bazate pe descărcările electrostatice ale acestor acumulatori prin organismul uman. Ca urmare a studiilor efectuate în laborator, B. Franklin (1706-1790) obţine vizualizarea descărcărilor produse între organisme vii încărcate electric diferit şi emite o primă

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ipoteză asupra polarizării organismului uman în condițiile încărcării electrostatice. Tot în acest secol, W. Watson (1715-1786) aduce în discuție legătura dintre electricitate și fenomenele psihofiziologice elaborând și o teorie proprie asupra mecanismelor gândirii omenești. În secolul următor medicul și fizicianul polonez Jacob Jodco Narkievich (1848-1904) obține înregistrări fotografice ale emisiilor electroluminescente de la nivelul anumitor zone ale organismului uman adus în contact cu surse de curent de înaltă frecvență.

În 1939 tehnicianul rus S.D. Kirlian observă întâmplător impresionarea filmelor fotografice aflate în apropierea corpului uman expus câmpurilor electromagnetice de unde ultrascurte. In anii 1960-1970 fenomenele de electroluminescență intră în preocupările unui grup de cercetători din SUA care organizează și un prim congres asupra fotografiei Kirlian.

În țara noastră cercetările de electrofiziologie pe bază de metode electrometrice au permis obținerea unor hărți electrice ale suprafeței corpului omenesc, cu semnificații funcționale și diagnostice - explorări electrodermale capabile să evidențieze caracteristicile electrice ale punctelor cunoscute în acupunctura tradițională chineză. Combinând principiile explorărilor electrodermale și ale tehnicii Kirlian, în 1975 s-a pus la punct o metodă nouă, denumită *electronografie* (Fl. Dumitrescu), caracterizată în principal prin controlul emisiei, propagării și transformării

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

energiei electronilor eliberați către probă de o sursă adecvată (denumirea aceasta este considerată depăşită în momentul de față).

2. Imaginile electronografice

Electronografia este o tehnică de electrografie prin electroluminescență, bazată pe efectul de ionizare luminescentă de la nivelul de separație a două medii electrice diferite. Variante de electrografie sunt şi următoarele:

-electrografie prin polarizare electrostatică, bazată pe efectul de încărcare electrostatică a unor materiale dielectrice şi semiconductoare;

-electrografia prin blocarea emisiei secundare de lumină, bazată pe efectul de stingere a luminescenței unui ecran fosforescent (excitat în prealabil prin intermediul luminii sau prin alt procedeu) în zonele în care este atins de un câmp electromagnetic tranzitoriu ce a traversat organismul uman;

-electrografia prin efect termic, bazată pe virajul cromatic al unui strat de cristale lichide, sub efectul termic al descărcărilor de înaltă tensiune dirijate prin organismul uman;

-electrografie prin efecte electrochimice, bazată pe resensibilizare a unei emulsii de halogenură de argint (desensibilizată în prealabil față de

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

lumină) ca urmare a impactului cu câmpul electromagnetic ce a traversat organismul uman;

-electrografia prin microunde, bazată pe reflexia diferențiată a microundelor de către un organism viu, din cauză că acesta se comportă ca un conductor neomogen şi anizotrop.

Imaginile electronografice se caracterizează prin trei aspecte (efecte), dintre care unul sau altul predomină în funcție de tehnica aleasă:

(a) aspectul pelicular sau al descărcărilor marginale fundamentale, ce are drept corespondent în tehnica Kirlian (deosebită de tehnica electronografică prin parametrii descărcării şi prin mecanismele care generează imaginile) fenomenul de vizualizare a "aurei";

(b) aspectul electromorf prin care unele detalii morfologice ale probei supuse unei descărcări de audiofrecvență se regăsesc pe imaginea electronografică (fără corespondent în tehnica Kirlian);

(c) aspecte ale mediului electric proximal, concretizate în contribuțiile interacțiunilor stratului aeroionilor aderenți la probă cu undele electromagnetice dirijate către probă.

- **Aspectul (efectul) pelicular**

Aspectul pelicular sau marginal constă în apariția unor radiații capabile să influențeze un strat fotosensibil în zonele din imediata

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

apropiere a limitelor fizice ale probei supuse electronografiei. Formele şi dimensiunile strimerilor ce apar diferă de la o expunere la alta ceea ce reflectă caracterul aleatoriu al fenomenului. Explicarea apariţiei strimerilor (*eng.* streamer = flamură, arborizaţie) presupune cunoaşterea teoriei descărcărilor electrice în avalanşă, a lui Townsend, a teoriei lui Loeb, Meck şi Raether, numită chiar teoria strimerilor precum şi a teoriei descărcării corona. Să reamintim câteva lucruri mai importante despre fiecare.

Teoria lui Townsend încearcă să explice descărcările electrice prin gaze prin ionizările succesive produse de electronii accelerați în câmpul electric constant dintre doi electrozi plani (anod-A şi catod-C) amplasați într-un gaz de presiune relativ mică. Fie $\mathbf{n_0}$ numărul inițial de electroni liberi aflați la catod, care, accelerați de câmpul **E** vor produce ionizări, astfel ca, la distanța **x** de catod, numărul de electroni devine **n** iar la distanța **x+dx** numărul lor creşte la **n+dn**.

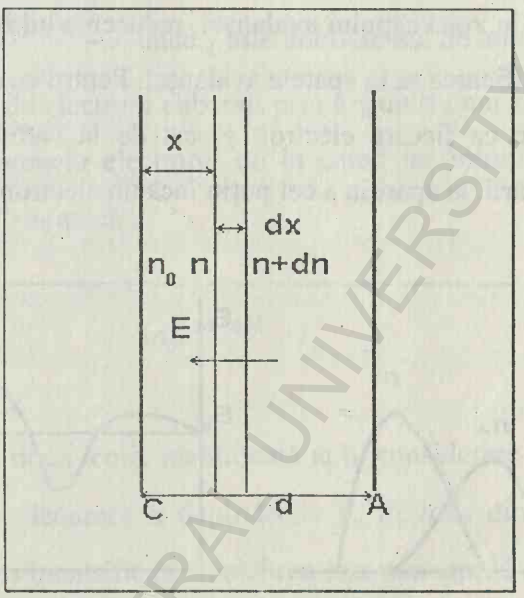
Dacă α este coeficientul de ionizare (numărul de ionizări produse de un electron pe unitatea de lungime) iar η este coeficientul de ataşare (numărul de electroni ataşați la molecule neutre pe fiecare unitate de drum) atunci este valabilă relația (1).

$$dn = n(\alpha - \eta)dx \tag{1}$$

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\int_{n_0}^{n} \frac{dn}{n} = \int_{0}^{x} (\alpha - \eta) dx \qquad (2)$$

$$n = n_0 \exp(\alpha - \eta)x \qquad (3)$$



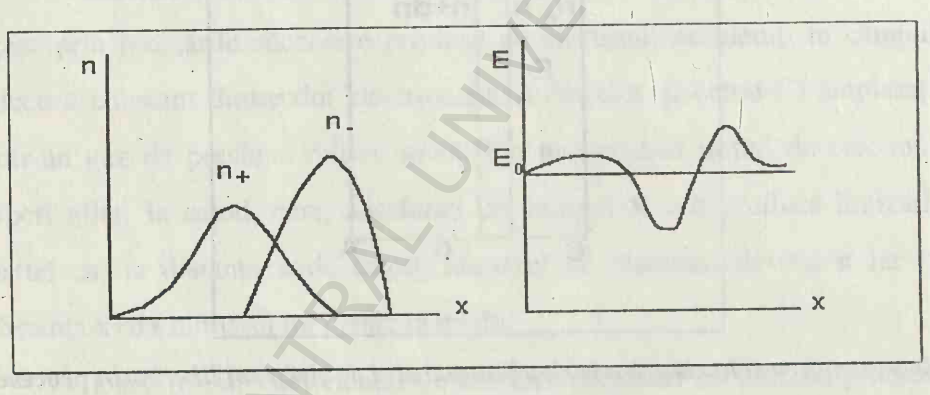
Reprezentarea schematică a variației numărului de electroni liberi prin **procese de ionizare și recombinare**

Prin integrare de la n_0 la **n**, respectiv 0 și **x** rezultă relația (2).

Pentru producerea avalanșei trebuie ca $\alpha > \eta$, acești coeficienți depinzând de câmp, avalanșa se va dezvolta numai dacă se depășește o anumita valoare E_{min} care, pentru condiții atmosferice normale, este de 30

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

V/cm. Datorită producerii avalanşei, în spaţiul dintre electrozi apar sarcini spaţiale: electroni de mobilitate mare în capul avalanşei şi ioni pozitivi de mobilitate mai mică, care rămân practic, imobili în spaţiul dintre electrozi. Apare astfel o deformare a câmpului electric iniţial, E_0, în sensul amplificării sale în zona capului avalanşei, reducerea lui în zona următoare şi, din nou, amplificarea sa în spatele avalanşei. Pentru ca descărcarea să nu se stingă trebuie ca fiecare electron plecat de la catod să conducă, în procesul descărcării, la apariţia a cel puţin încă un electron.



Distribuţia spaţială a concentraţiilor de ioni pozitivi şi negativi şi variaţia intensităţii câmpului electric.

Într-adevăr, dacă n_0 este numărul iniţial de electroni liberi de la catod şi $n_0 e^{(\alpha-\eta)d}$ este numărul electronilor ajunşi la anod atunci numărul de

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

sarcini nou formate, în spațiul dintre electrozi, în această etapă este $n_0 e^{(\alpha-\eta)d} - 1$ (numărul de sarcini pozitive nou create este egal cu cel al sarcinilor negative nou create). Ionii pozitivi formați în spațiul dintre electrozi se deplasează către catod şi prin bombardarea acestuia rezultă un număr $n'_0 = \gamma n_0 e^{(\alpha-\eta)d} - 1$ unde γ este coeficientul de ionizare superficială, egal cu numărul de electroni eliberați prin acțiunea unui singur ion pozitiv. Astfel se pot regenera electronii de la catod iar întreținerea descărcării presupune ca $n_0' > n_0$ adică :

$$\gamma n_0 e^{(\alpha-\eta)d} - 1 \qquad (4)$$

Cea de-a doua teorie menționată ia în considerare şi efectul sarcinii spațiale. Aşadar, deoarece α depinde de E, în zona din capul avalanşei, unde E prezintă o intensificare, ionizarea este mai rapidă în timp ce în zona de intensitate redusă a lui E, electronii au viteze reduse putându-se ataşa la particule neutre şi formând astfel ioni negativi, practic imobili, care, alături de ionii pozitivi existenți în avalanşă conduc la apariția unui canal de plasma (strimer).

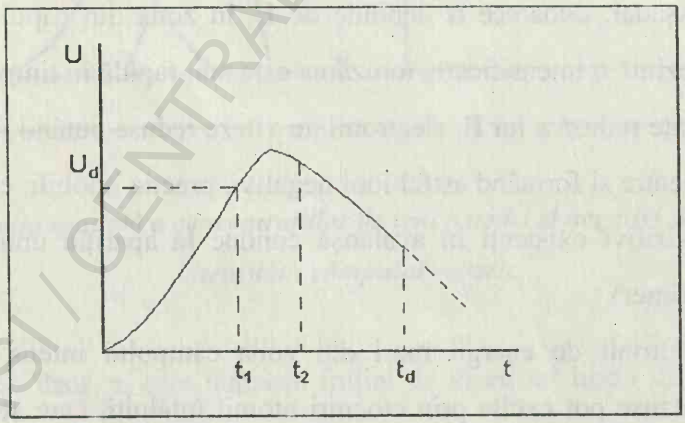
Electronii de energii mari din zona câmpului intens din capul primei avalanşe pot excita prin ciocniri atomii întâlniți, care se dezexcită prin emisie de fotoni de mare energie, capabili, la rândul lor să producă

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

fotoelectroni, deci se va dezvolta o nouă avalanşă, care contribuie la dezvoltarea canalului de plasmă. Existenţa strimerului duce la intensificarea câmpului şi deci, la realizarea condiţiilor necesare producerii de noi fotoni.

Dacă la momentul $t=0$ se aplică între electrozi un impuls de tensiune care, la momentul t_1 are valoarea U_d corespunzătoare lui E_{min}, se poate ca descărcarea să nu înceapă dacă nu există nici un electron liber.

Apariţia acestuia, la un moment $t_2>t_1$ este un fenomen aleatoriu astfel că intervalul de timp $t_i=t_2-t_1$, numit timp de întârziere are un caracter statistic. Începând din momentul t_2 se dezvoltă procesul ce duce la descărcarea dintre electrozi, care se va declanşa la momentul t_d. Intervalul t_d-t_2 are şi el un caracter statistic.



Variaţia tensiunii electrice în timp

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Descărcarea corona este o descărcare autonomă, incompletă, caracteristică câmpurilor puternic neuniforme. Ea se declanşează la suprafaţa unui electrod cu raza de curbură mică în momentul când intensitatea câmpului electric indeplineşte condiţia de autonomie a descărcării. Datorită scăderii rapide a intensităţii câmpului electric, strimerul care se dezvoltă de la acest electrod nu ajunge la electrodul opus şi astfel descărcarea se limitează la o zonă redusă în jurul electrodului cu raza de curbură mică, limitată în condiţii atmosferice normale de un câmp de 26 kV/cm. Pentru determinarea intensităţii câmpului critic de apariţie a descărcării corona în cazul unui conductor cilindric se utilizează formula lui Peck:

$$E_c = 31\delta\left[1+\frac{0,308}{\sqrt{\delta r}}\right] \qquad (5)$$

unde E_c, în kV/cm este valoarea amplitudinii câmpului critic, în curent alternativ, **r**, în cm, este raza conductorului, δ=3,92 pT^{-1} este densitatea relativă a aerului, **p**, în cm Hg este presiunea aerului, **T**, în grade Kelvin este temperatura ambientală.

Electronografia presupune aplicarea unui impuls unic de tensiune; imaginea de strimer va apărea dacă energia câmpului electric este suficientă pentru a produce amplificarea necesară a fluxului de electroni

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(unic şi având sens unic). Lungimea strimerilor depinde de valoarea tensiunii de străpungere; emisia de electroni mai este dependentă şi de natura materialului din care este constituit catodul; oţelul oxidat şi nichelul având cele mai mari emisii de electroni iar organismele vii, cea mai mică.

- **Efectul (aspectul) electromorf**

Efectul electromorf este caracteristic imaginii electronografice şi este reproductibil, spre deosebire de strimeri, a căror geometrie este guvernată de caracterul aleator. El este cauzat de interacţiunea câmpului electromagnetic ce trece prin probă cu diferitele structuri ale acesteia, caracterizate de parametri electrici diferiţi; neomogenitatea electrică a probei este reprodusă la nivelul senzorului fotosensibil (traductorul chimic). Într-o reprezentare schematică, fluxul de electroni emişi de generatorul de impuls din alcătuirea electronografului, este antrenat în circuitul RC constituit de impedanţa probei şi de condensatorul "incomplet" constituit din:

- o armătură metalică plană şi un electrod punctiform între care se produce descărcarea;

-senzorul fotosensibil (film, hârtie fotografică etc.);

-proba supusă investigaţiei;

-un strat dielectric (facultativ) suprapus peste probă şi senzor.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Când proba este o parte a organismului uman, stratul hidrolipidic de la suprafața lui "completează" a doua armătură a condensatorului echivalent.

- **Efectul (aspectul) proximal**

Efectul proximal sau peri-proximal rezultă din influența proprietăților electromagnetice ale mediului ambiental asupra formei şi intensității luminoase a descărcării. El este reproductibil în măsura în care se pot controla condițiile de temperatură, presiune, umiditate şi pH ale mediului din imediata apropiere a probei. Variațiile parametrilor menționați, ca şi ale compoziției chimice a atmosferei în care se produce descărcarea sau ale gradului de ionizare prealabilă a acestei atmosfere pot induce modificări esențiale în claritatea şi luminozitatea imaginii electronografice. Dacă se lucrează cu un țesut biologic atunci şi variațiile de stare fiziologică ale acestuia pot avea unele influențe asupra reproductibilității efectului proximal.

3. Schema dispozitivului de electronografie

Principalele părți componente sunt:

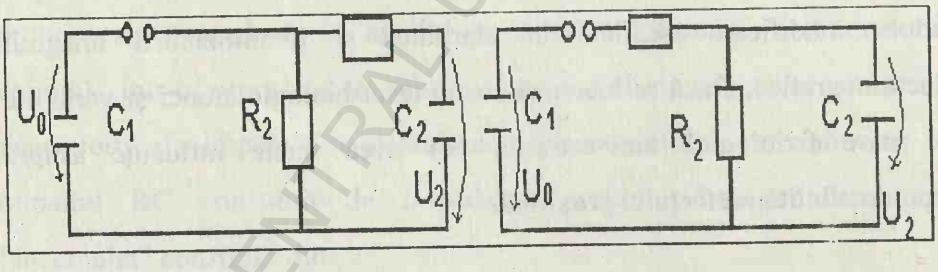
(a) generatorul de impuls de tensiune;

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(b) dispozitivul de expunere (cel mai frecvent de tipul condensatorului incomplet);

(c) dispozitivul de înregistrare a imaginii electronogràfice (poate fi orice senzor fotosensibil adecvat cazului concret de investigație: film fotografic, hârtie fotografică, ecran TV etc.)

În cazul dispozitivului aflat în laborator, dispozitivul de expunere este de tipul condensatorului incomplet: o placă metalică şi un electrod "punctiform" de nichel iar înregistrarea se face cu ajutorul hârtiei fotografice. Să detaliem problema generatorului de impuls. Schema de principiu trebuie să conțină cel puțin două elemente nedisipative de energie: fie două condensatoare, fie un condensator şi o inductanță.



Schema de principiu a generatorului de semnal

Există şi scheme cu patru elemente nedisipative: două condensatoare şi două impedanțe. În schemele reprezentate aici se pot

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

vedea variante ale generatorului de impuls de tensiune cu două condensatoare. Condensatorul C_1 este încărcat de la o sursă de tensiune continuă până la valoarea U_0. În momentul când are loc străpungerea spațiului dintre contactele eclatorului de amorsare, C_1 se descarcă pe impedanța de sarcină alcătuită din C_2 şi rezistența R_2 , prin intermediul rezistentei R_1 şi a rezistenței de amortizare R_a. Alegerea adecvată a parametrilor schemei permite controlul asupra tensiunii U_2.

Tratarea matematică a fenomenelor electrice din schema dispozitivului generatorului de tensiune se poate realiza prin mai multe metode: prin integrarea directă a ecuațiilor lui Kirchoff, prin intermediul transformatei Laplace (metoda operațională), prin intermediul transformatei Fourier (metoda analizei spectrale), prin metoda răspunsului tranzitoriu etc. Generatoarele de impuls de tensiune cu care se lucrează curent au mai multe etaje, în care condensatoarele se încarcă în paralel şi se descarcă în serie. Cel mai adesea parametrii impulsului de tensiune obținut sunt: amplitudinea de 1-40 KV, timpul de creştere a tensiunii de maxim 5 μs, timpul de descreştere a tensiunii de minimum 50 μs, forma impulsului, în general triunghiulară.

Alimentarea se face de la o sursă de tensiune continuă de 12-20 V la un curent de maxim 1 mA. Descărcarea condensatorului se efectuează pe primarul unei bobine de inducție de automobil.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Controlul timpului de expunere a probei se realizează prin intermediul unui comutator cu două poziții ce introduce într-o ramură a circuitului o capacitate electrică variabilă.

MODUL DE LUCRU

- I. Se efectuează un test preliminar asupra unei probe vii şi a uneia inerte. Pentru aceasta:
- Se conectează electronograful la sursa de tensiune de alimentare.
- Se alege pentru investigație o probă de țesut biologic (o frunză detaşată de plantă) şi o probă inertă (o monedă sau o cheie metalică) care se plasează între armăturile condensatorului incomplet ce constituie dispozitivul de expunere.
- Sub probe, în contact direct cu armătura plană se plasează hârtia fotografică (se lucrează în obscuritate).
- Se fixează polaritatea descărcării.
- Se alege timpul de expunere mai mare şi se declanşează pulsul de tensiune.
- Se întrerupe alimentarea electrică şi se trece hârtia fotografică în revelator (circa 2 minute), apă, fixator.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- Se analizează comparativ imaginile obținute pentru cele două probe descriindu-se în fiecare caz efectul electromorf, pelicular şi proximal, înscriindu-se în tabel.

II. Dacă impresionarea senzorului este prea puternică afectând calitatea imaginii se reia experimentul utilizând şi o placă dielectrică din sticlă suprapusă peste probe; se poate acționa şi asupra reducerii tensiunii de alimentare. Se mențin ceilalți parametri constanți şi se procedează din nou la analiza comparativă. Se notează observațiile făcute.

III. Se reia experimentul alegând timpul de expunere mai mic, atât în varianta de la (I) cât şi în cea de la (II). Se notează observațiile. Se apreciază în care caz este mai relevant efectul electromorf şi în care caz cel pelicular. Se încearcă menținerea constantă a condițiilor ambientale.

În ANEXĂ sunt prezentate imagini de tipul celor utilizate în diagnosticul medical, obținute în polaritate pozitivă şi negativă pentru mână şi picior, cazul normal şi cel patologic. De regulă, în cazurile patologice, distribuția strimerilor în jurul conturului imaginii este neuniformă, "aura" fiind slabă sau chiar absentă în anumite regiuni aflate în corespondență directă cu anumite organe interne.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

TABEL CU OBSERVAȚII EXPERIMENTALE

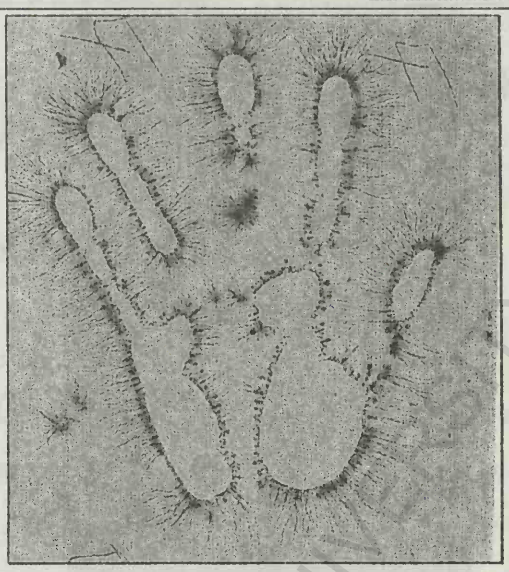
Proba	Amplitudinea pulsului de tensiune	Durata pulsului	Polaritatea	Efect electromorf	Efect pelicular	Efect proximal
1						
2						
3						

ÎNTREBĂRI

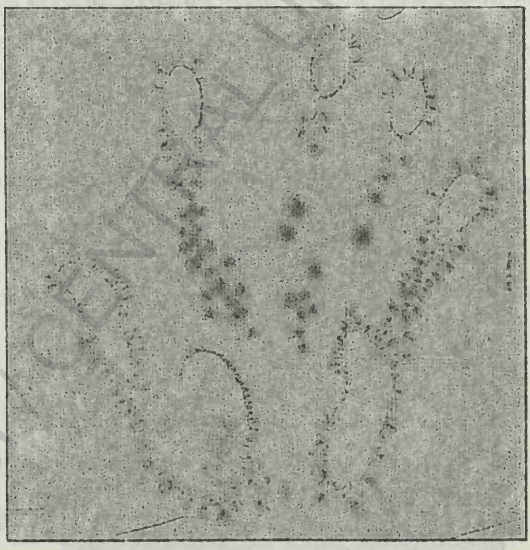
1. Care sunt părțile componente ale unui dispozitiv de descărcare electrică de tip Corona prin probe biologice sau inerte?
2. Care este alcătuirea de pricipiu a generatorului de puls de tensiune?
3. Care sunt principalele "efecte" ale imaginii electronografice?

ANEXĂ. Imagini electronografice pentru mână și picior

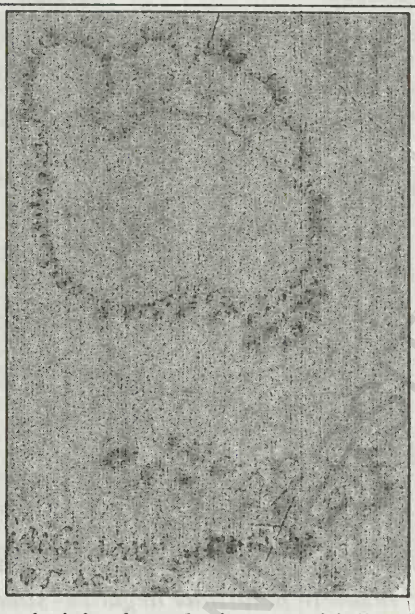
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



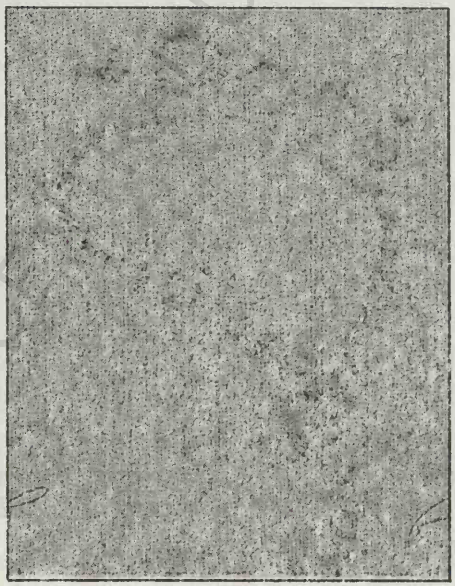
Imaginea unei mâini în polaritate negativă- subiect sănătos



Imaginea unei mâini in polaritate pozitivă-subiect patologic



Imaginea unui picior în polaritate pozitivă-subiect normal



Imaginea unui picior în polaritate pozitivă-subiect patologic

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2. STUDIUL EFECTELOR DESCĂRCĂRII CORONA ASUPRA PLANTULELOR DE GRAMINEE

MATERIALE ŞI DISPOZITIVE NECESARE

- Dispozitiv de descărcare în gaze (electronograf)
- Culturi de plantule de graminee, grâu sau secară (sau papaveracee ca macul şi rostopasca) dezvoltate în cutii Petri, pe suport de hârtie umectată sau în mediu natural (sol); este nevoie de cariopside cu genofond uniform, provenite din loturi experimentale, pentru a limita cât mai mult variabilitatea fenotipică
- Balanță pentru determinarea mesei de țesut verde
- Riglă pentru evaluarea lungimilor
- Reactivi pentru extracția pigmenților clorofilieni şi carotenoizi (acetonă 85% în apă distilată)
- Mojar cu pistil pentru mărunțirea țesutului verde destinat extracției de pigmenți
- Spectrofotometru sau spectrocolorimetru pentru citirea absorbanțelor la lungimile de undă prevăzute la lucrarea **Efectele iradierilor directe ale semințelor asupra creşterii plantelor**

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

MODUL DE LUCRU

- Se lasă să germineze câte 50 de cariopside în fiecare cutie Petri pe suport de hârtie umectată, la întuneric şi la temperatură de 24 grade Celsius. Numărul de cutii Petri este în funcţie de numărul de variante de experiment şi de numărul de probe din fiecare variantă de experiment
- După germinare se lasă plantulele să se dezvolte într-un regim de 12 ore lumină/12 ore întuneric la temperatură de 24 grade Celsius, timp de 6-7 zile
- Pentru o primă variantă de experiment se aplică plantulelor din fiecare cutie Petri (fiecare probă) câte un număr diferit de pulsuri de tensiune (de descărcări electrice) la fiecare 15 minute, pe o durată de două ore. De exemplu, la proba 1 se aplică câte un 3 pulsuri de tensiune, ..., la proba 5 câte 15 pulsuri de tensiune etc. Pulsurile vor fi identice, având amplitudinea cea mai mare şi durata cea mai mică, în polaritate pozitivă.
- Se va relua experimentul în mai multe variante, la fiecare variantă fiind diferite valorile parametrilor fizici ai pulsurilor de tensiune (amplitudine, durată, polaritate)
- Se efectuează măsurători asupra lungimilor plantulelor la probe şi la martori şi se tabelează rezultatele. În tabelul centralizator se trec

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

valoarea medie, deviația standard şi rezultatul testului Student sau, dacă se aplică metoda box-plot, se trec valorile parametrilor A_1, A_3, M, Q_1, Q_3.

- Se cântăresc plantulele atât pentru martori cât şi pentru probe şi se tabelează
- Se efectuează dozarea spectrofotometrică a conținuturilor de pigmenți asimilatori şi se tabelează în tabelul centralizator valorile pentru clorofila *a*, clorofila *b* şi total pigmenți carotenoizi

Notă. Pentru ca modificările induse de radiații în probe să fie semnificative din punct de vedere statistic, fiecare probă (ca şi martorul) trebuie repetată de câteva ori iar apoi se aplică testul Student (cu ajutorul programelor MsExcel).

TABEL CU DATE EXPERIMENTALE

	Parametrii pulsului de tensiune	Durata expunerii	Masa totală	Lungimea plantulelor		Conținuturile de pigmenți asimilatori		
				Media	Deviația standard	chl *a*	chl *b*	t. c.
1								
2								
3								

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

EFECTELE RADIAȚIILOR ULTRAVIOLETE ASUPRA UNOR LICHIDE BIOLOGICE

SCOPUL EXPERIMENTULUI

Cunoaşterea principalelor efecte induse de radiaţiile electromagnetice din domeniul ultraviolet în biosisteme; se propune evidenţierea modificărilor indicelui de refracţie al sucurilor vegetale expuse la radiaţii ultraviolete.

MATERIALE ŞI DISPOZITIVE NECESARE

- Sursă de radiaţii ultraviolete (lampă de ultraviolete)
- Refractometru
- Storcător electric pentru prepararea sucurilor vegetale
- Cutii Petri, pipete, flacoane de sticlă
- Balanţă

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI F I Z I C Ă

FENOMENOLOGIE

Radiaţiile ultraviolete sunt radiaţii electromagnetice mai puţin energetice decât radiaţiile ionizante electromagnetice (fotonii X şi γ) şi se consideră că, spre deosebire de acestea, nu sunt caracterizate prin

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

capacitatea de ionizare. Efectele lor biologice nu sunt însă deloc nesemnificative, din contra, adesea reprezintă cauzele unor malformații genetice sau ale cancerizărilor. Energiile cuantelor de radiații sunt mai mici de 10 eV

Principala sursă naturală de radiații ultraviolete o reprezintă emisiile solare iar principalul factor modulator al fluxurilor de radiații care ajung la nivelul biosferei îl reprezintă atmosfera - straturile de ozon din păturile exterioare ale atmosferei absorbind puternic aceste radiații.

Spre deosebire de radiațiile ionizante, radiațiile ultraviolet nu au efecte notabile asupra apei, apa neavând, practic absorbție la lungimi de undă de peste 185 nm.

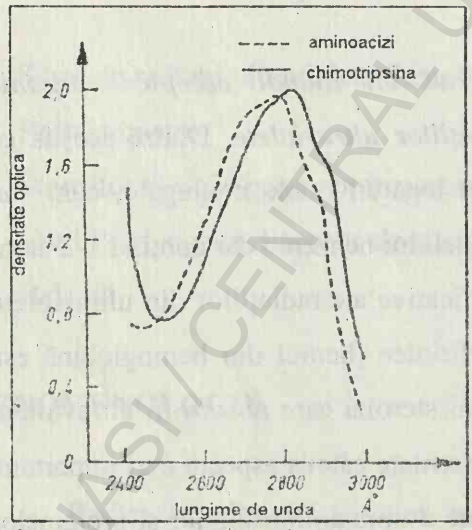
Dintre constituienții materiei vii numai compușii organici nesaturați sunt absorbanți ai radiațiilor ultraviolete. Dintre aceştia cei mai importanți sunt cei care conțin legături duble conjugate, cum sunt inelele benzenice şi inelele de tipul inelului benzenic dar conținând 1-2 atomi de azot, capabile de absorbții semnificative ale radiațiilor din ultravioletul îndepărtat precum şi structurile porfirinice (hemul din hemoglobină este exemplul cel mai des invocat) şi unii steroizi care absorb în ultravioletul apropiat. În cele ce urmează sunt prezentate câteva aspecte mai importante privind acțiunea radiațiilor ultraviolete asupra aminoacizilor şi proteinelor, acizilor nucleici precum şi asupra unor pigmenți cu importanță biologică fundamentală cum sunt rodopsina, fitocromul, clorofilele.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1. Absorbția radiațiilor ultraviolete în moleculele proteinelor

Dintre resturile de aminoacizi care se regăsesc în constituția proteinelor, cele cu rol de cromofor în raport cu absorbția radiațiilor din domeniul ultraviolet sunt triptofanul și tirozina, care se caracterizează prin spectre electronice de absorbție cu maxime situate la lungimi de undă peste 250 nm, precum și cistina și cisteina. Pe de altă parte, maxime de absorbție sub 240 nm prezintă și legăturile peptidice (CONH) dintre resturile de aminoacizi, care, fiind în număr mare, au absorbții cu intensitate semnificativă la nivelul unei molecule proteice.

Din datele spectrofotometriei de absorbție rezultă că legarea aminoacizilor în molecule proteice nu presupune interacțiuni puternice, deoarece spectrele unui amestec de molecule de aminoacizi nu diferă semnificativ de cel al structurii proteice pe care aceștia o alcătuiesc.



Spectrul de absorbție al chimotripsinei în comparație cu cel al amestecului de aminoacizi componenți (Grémy și Perrin, 1976)

Ce se întâmplă cu stabilitatea moleculelor proteice în urma absorbțiilor unor radiații ultraviolete? Cel mai adesea în

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

urma expunerii la radiațiile ultraviolete, structurile lor terțiare, cuaternare etc. sunt destabilizate astfel că moleculele proteice cu activitate enzimatică sunt degradate, pierzându-şi rolul de biocatalizator al reacțiilor biochimice. Grupările de atomi care sunt direct implicate în acest fenomen sunt legăturile disulfurice din resturile de aminoacizi sulfurați, cistina şi cisteina. De altfel şi randamentul quantic al efectului radiațiilor ultraviolete asupra enzimelor este proporțional cu numărul de resturi cistinice din molecula enzimei.

Este posibil, însă, ca în urma energizărilor produse prin absorbția radiațiilor ultraviolete, unele molecule să disocieze în radicali liberi, ceea ce înseamnă, între altele şi ***scăderea masei moleculare medii şi a densității. Cum indicele de refracție a unei soluții depinde de concentrația acesteia, măsurătorile refractometrice pot evidenția, macroscopic, efectele ultravioletelor asupra unor lichide biologice.***

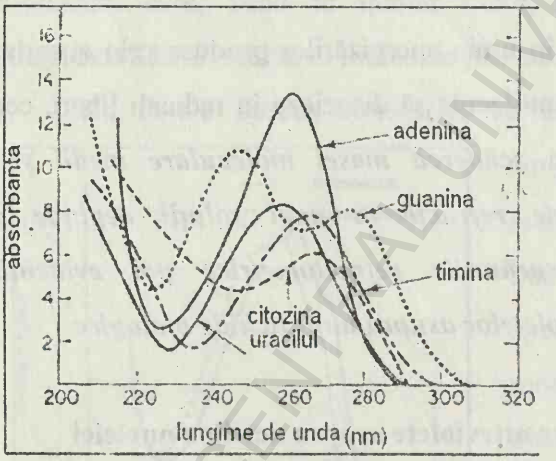
2. Acțiunea radiațiilor ultrviolete asupra acizilor nucleici

Spre deosebire de proteine la acizii nucleici avem doar o structură primară şi una secundară. Prin absorbția unor cuante de radiații ultraviolete structura primară se poate altera din cauza modificărilor pe care le suferă bazele purinice (adenina şi guanina) şi pirimidinice (timina şi citozina). În figura alăturată se vede că aceste baze, ca şi uracilul, care, în ARN

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

înlocuieşte timina din *ADN*, au maximele spectrelor electronice de absorbţie între 240 nm şi 280 nm.

Dacă se compară spectrul de absorbţie din ultraviolet al *ADN* -ului cu cel al unui amestec compus din baze azotate care intră în molecula sa, spre deosebire de cazul proteinelor, se constată că intensitatea din maximul benzii de absorbţie a moleculei de *ADN* este inferioară celei din spectrul amestecului de baze azotate - indiciu asupra interacţiunii puternice dintre acestea.



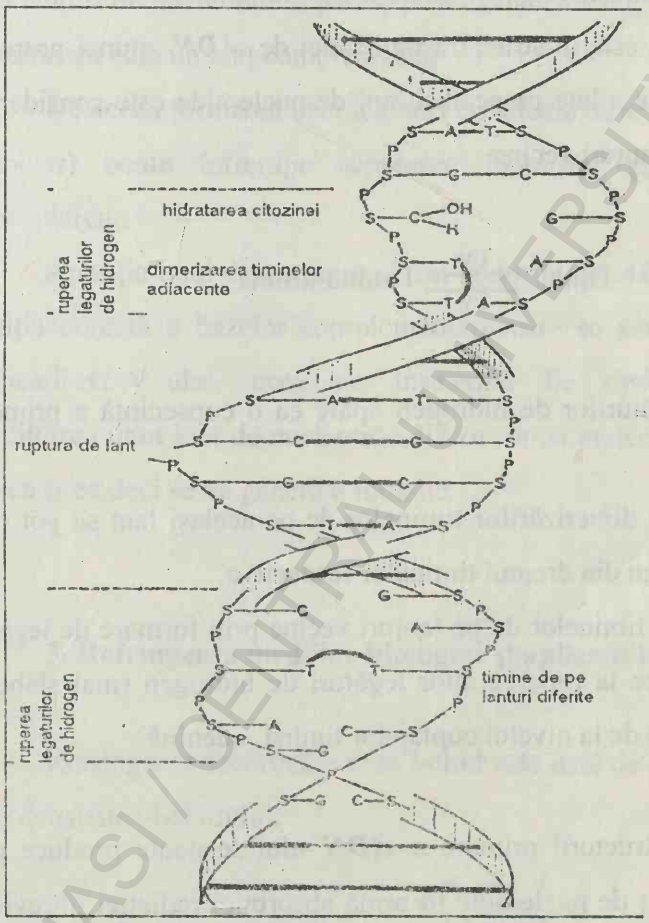
Spectrele electronice de absorbţie în ultraviolet ale bazelor azotate (Grémy şi Perrin, 1976)

Efectele radiaţiilor ultraviolete absorbite în moleculele acizilor nucleici sunt datorate modificărilor ce apar la nivelul timinei şi citozinei (în *ADN*) respectiv al uracilului şi citozinei (în ARN).

- Hidratarea pirimidinelor. Prin cuplarea unei molecule de apă la nivelul unuia din atomii de carbon, citozina devine citozină hidratată şi poate reveni la forma iniţială sub acţiunea căldurii sau a unui acid.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\text{Citozină} + H_2O \underset{\text{T,acid}}{\overset{\text{UV}}{\rightleftharpoons}} \text{Citozină-OH}$$



Modificările induse de radiațiile UV în molecula de ADN

O consecință a acestui fapt poate fi ruperea unor legături de hidrogen, responsabile de structura secundară a moleculei de *ADN*.

- Dimerizarea timinei este un efect mai important care are, de asemenea, caracter reversibil. Se vede că

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

reacția este determinată în ambele sensuri de prezența radiațiilor ultraviolet, echilibrul fiind dat de lungimea de undă, de exemplu, pentru $\lambda = 280nm$ există 60% dimeri și 40% monomeri, în timp ce pentru $\lambda = 240nm$ există 20% dimeri și 80% monomeri.

Dacă timina este în structura moleculei de *ADN* atunci proporția de timine dimerizate aflate pe același lanț de nucleotide este considerabil mai mare decât pe lanțuri vecine.

$$\text{Timină} \underset{\text{UV}}{\overset{\text{UV}}{\rightleftharpoons}} \text{Timină-timină}$$

Dezorganizarea legăturilor de hidrogen apare ca o consecință a primelor două efecte.

Ca urmare a dimerizărilor timinelor de pe același lanț se pot rupe legăturile de hidrogen din dreptul timinelor respective.

Dimerizarea timinelor de pe lanțuri vecine prin formare de legături covalente poate duce la ruperea altor legături de hidrogen (mai slabe ca legăturile covalente) de la nivelul cuplajelor timină -adenină.

- Destabilizarea structurii primare a *ADN* -ului se poate produce prin ruperea unui lanț de nucleotide în urma absorbției radiației ultraviolet (ruperea legăturii dintre o moleculă de zahăr și o grupare fosfat).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Consecințele biologice ale acestor modificări biochimice sunt legate de autoreplicarea *ADN* -ului fenomen prin care de-a lungul fiecăruia dn cele două lanțuri de nucleotide separate prin desfacerea legăturilor de hidrogen, se formează câte un lanț complementar.

De aceea formarea unei legături covalente între lanțuri (dimerizarea timinelor) poate întrerupe separarea lanțurilor şi poate împiedeca autocopierea.

Apariția unui dimer pe unul din lanțurile de *ADN* poate împiedeca apariția corectă a bazelor complementare care se sintetizează în timpul duplicării *ADN* -ului, ceea ce înseamnă fie oprirea replicării fie constituirea unui lanț de nucleotide diferit; noua moleculă de *ADN* se va replica şi ea deci se va genera o mutație.

3. Refringența mediilor biologice şi aplicații biomedicale

Refringența specifică a unui lichid este dată de indicele de refracție şi de densitatea lichidului:

$$r = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 1}\frac{1}{\rho}$$

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

după cum au arătat H. Lorenz şi L. Lorenz. Indicele de refracţie al unei substanţe variază cu densitatea (creşte odată cu densitatea), cu starea ei de agregare (cu temperatura) şi cu structura chimică a compuşilor solviţi, dacă lichidul este o soluţie. Producerea de reacţii chimice între constituienţii unui amestec poate modifica foarte mult refringenţa. Produsul dintre refringenţă şi masa molară se numeşte refracţie molară. În cazul compuşilor organici, legăturile duble sau triple aduc modificări ale refringenţei.

Aplicaţia medicală cea mai răspândită este determinarea conţinutului total de proteine din serul sangvin, din exudate şi transudate (urina, saliva, lacrimile, laptele etc.). În mod normal indicele de refracţie al serului sangvin este de 1,3487-1,3517 la temperatura de 17,5 ^{0}C.

În cazul unor pacienţi cu anumite afecţiuni, de exemplu în cursul şocului anafilactic, indicele de refracţie înregistrează mai întâi o scădere (în primele ore) iar apoi o revenire la valorile normale; în cazurile grave, valorile indicelui de refracţie depăşesc pe cele normale.

Valorile normale pentru indicele de refracţie al urinei se înscriu între 1,33 şi 1,34. Pentru cercetările biologice, variaţia indicelui de refracţie la sucurile vegetale în funcţie de unii parametri chimici, biologici şi, mai ales, fizici se dovedeşte de mare utilitate datorită accesibilităţii metodelor de măsură, pe de o parte şi datorită caracterului de indicator

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

macroscopic al compoziției lichidelor pe care îl are refringența (implicit și indicele de refracție).

MODUL DE LUCRU

- Se prepară sucuri vegetale prin presare mecano-electrică (din morcov, cartof, măr, citrice, frunze etc.) pentru a servi drept probe pentru determinările de refringență.

- Se determină densitatea fiecărei probe preparate la (1).
- Se determină indicele de refracție cu ajutorul refractometrului.

- Se expune fiecare probă la radiațiile emise de o sursă (lampă) de ultraviolete pe durata de minimum o oră.

- Se determină densitatea fiecărei probe după expunerea la radiații ultraviolete.
- Se determină indicele de refracție cu ajutorul refractometrului Pulfrich pentru fiecare probă, la aceeași temperatură ca și inițial.

- Se calculează refringența și se tabelează. Se interpretează rezultatele.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

TABEL CU DATELE EXPERIMENTALE

proba	Înainte de expunere la ultraviolete			După expunere la ultraviolete		
	Densitate (g/cm^3)	Indice de refracție	refringența	Densitate (g/cm^3)	Indice de refracție	Refringența

ÎNTREBĂRI

1. Care sunt principalii constituienți ai materiei vii care absorb radiațiile ultraviolete?
2. Ce efecte poate avea absorbția radiațiilor ultraviolete în moleculele proteice?
3. Ce efecte poate avea absorbția radiațiilor ultraviolete în moleculele acizilor nucleici?
4. Ce este refringența? dar refracția molară?
5. Ce aplicații au măsurătorile refringenței în medicină și biologie?

Notă. Pentru ca modificările induse de radiații în probe să fie semnificative din punct de vedere statistic, fiecare probă (ca și martorul) trebuie repetată de câteva ori iar apoi se aplică testul Student (cu ajutorul programelor MsExcel).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

INFLUENȚA RADIAȚIILOR ASUPRA TENSIUNII SUPERFICIALE A SERULUI SANGVIN

SCOPUL EXPERIMENTULUI

Evidențierea efectului radiațiilor ionizante asupra componentelor sîngelui, pe baza măsurătorilor de tensiune superficială.

MATERIALE ŞI DISPOZITIVE NECESARE

- Probe de ser sangvin (uman sau animal), tratat cu anticoagulant, în cantitate suficientă pentru a asigura o precizie bună la determinarea experimentală prin metoda stalagmometrică; apă distilată
- Sursa de radiații γ (sursa de Cobalt pentru uz de laborator)
- Stalagmometru
- Balanță şi pipete pentru evaluarea densității (determinare de masă şi volum).

FENOMENOLOGIE

1. Acțiunea radiațiilor asupra componentelor serului sangvin

Radiațiile ionizante de natură electromagnetică, cum sunt fotonii X şi gamma, interacționează atât cu moleculele de apă cât şi cu diversele

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

macromolecule din componența sângelui, ceea ce poate duce la importante modificări structurale ale acestora. Astfel, pe lângă efectele caracteristice, de ionizare a moleculelor mici şi a macromoleculelor, radiaţiile produc, în mediul apos din organismele vii, fenomenul de radioliză a apei, a cărui reacţie globală se scrie:

$$H_2O+h\nu \Rightarrow OH^{\bullet}+H^{\bullet}$$

Macromoleculele proteice pot suferi energizări directe:

$$M+h\nu \Rightarrow M^{*}$$

sau indirecte:

$$M_1+h\nu \Rightarrow M_1^{*}, \qquad M_1^{*}+M_2 \Rightarrow M_1+M_2^{*}$$

De asemenea, macromoleculele pot să sufere radioliza, desfăcându-se în radicali liberi macromoleculari:

$$M+h\nu \Rightarrow M_1^{\bullet}+M_2^{\bullet}$$

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

O parte din energia fotonilor absorbiți de unele molecule se poate transforma în energie internă a sistemului, modificând local temperatura acestuia.

În mod firesc, ca urmare a acestor modificări, interacțiunile intermoleculare se modifică şi tensiunea superficială la contactul cu aerul îşi schimbă valoarea.

Aceasta deoarece tensiunea superficială a unei interfețe este influențată de o serie de factori cum sunt: *temperatura, gradul de dispersie, natura moleculară, concentrația substanțelor solvite, depunerile de ioni pe interfață* etc.

2. Factorii de care depinde tensiunea superficială

- **Temperatura** în creştere duce la intensificarea agitației moleculelor, la îndepărtarea lor relativă, la slăbirea forței de atracție intermoleculară deci la scăderea tensiunii superficiale, care se anulează la atingerea unei temperaturi critice.

De exemplu, energia specifică a unității de suprafață de pe suprafața de separație aer-apă este de $74,22.10^{-3}$ Jm^{-2} la $10\ ^0$ C şi de $67,91\ .10^{-3}$ Jm^{-2} la $50\ ^0$C. Dintre formulele empirice care s-au propus pentru a reda variația

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

tensiunii superficiale σ cu temperatura, menționăm (pentru fluide cu molecule neasociate):

$$\sigma_T = K\left(1 - \frac{T}{T_c}\right)^n$$

unde n este cuprins între 1 şi 2, T_c este temperatura critică, iar K este o constantă ce depinde de natura lichidului, sau (pentru lichide ale căror molecule se asociază, cum este apa):

$$\sigma_T = K_1(T_c - T - \delta)$$

unde K_1 şi δ sunt constante empirice care depind de natura lichidului.

- **Gradul de dispersie** a uneia din cele două substanțe ce definesc o interfață influențează tensiunea superficială a interfeței în sensul că odată cu creşterea gradului de dispersie creşte aria totală a suprafetei dispersate, deci creşte tensiunea superficială.
- **Natura moleculelor** influențează tensiunea superficială a unei interfețe în sensul că, menținând un acelaşi fluid în contact cu diferite substanțe, tensiunea superficială are valori diferite. Astfel la interfața apa-aer σ=73 dyn/cm (73.10^{-3} N/m) dar la interfața apă-cloroform, σ=29

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

dyn/cm; la interfața aer-hidrogen lichid σ=2dyn/cm, la interfața dintre aer şi oxigen lichid σ=13 dyn/cm iar la interfața aer-mercur σ=436 dyn/cm.

În general la contactul cu aerul, este mai mare tensiunea sueprficială a lichidelor ce au punctul de fierbere mai ridicat (coeziunea moleculară mai mare). La temperatura normală, lichidele, cu excepția mercurului, au tensiunea superficială sub 100 dyn/cm, valoarea cea mai mare fiind a apei oxigenate şi anume de 76 dyn/cm la 18 ^{0}C (la contactul cu aerul). Dacă valorile energiei specifice superficiale a două fluide față de aer sunt egale, atunci energia interfacială a celor două fluide în contact se anulează şi ele difuzează unul în celălalt.

În cazul apei, cele mai multe dintre substanțele dizolvate (de exemplu alcoolii, acizii organici, detergenții, de regulă substanțe organice cu lanțuri lungi de atomi de carbon şi număr mic de radicali oxidril sau carboxil) duc la scăderea lui σ deci sunt tensioactive.

- **Depunerile spontane de ioni** prin adsorbție pe suprafețele ce separă medii nemetalice, produc diferențe de potențial de contact şi fac să varieze tensiunea superficială.

3. Rolul tensiunii superficiale în organismele vii

Cercetările efectuate pe lichidele biologice au arătat că tensiunea superficială are un rol semnificativ în patologie şi terapeutică. S-a găsit că

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

serul sangvin are în medie o valoare σ de 67 dyn/cm la om în timp ce la cal această valoare este de 62 dyn/cm. Valoarea lui σ pentru serul sangvin creşte uşor în tuberculoze şi sifilis dar scade în arterioscleroză, uremie, ictere şi neoplazii. Vomitivele, purgativele, diureticele cresc tensiunea superficială a serului în timp ce narcoticele duc la scăderea acesteia. Comportarea proteinelor în soluţie apoasă în prezenţa oleatului de sodiu este de natură să contracareze rolul tensioactiv al acestuia. Astfel, în lipsa proteinelor, oleatul de sodiu se îndreaptă spre suprafaţa lichidului ducând la scăderea tensiunii superficiale dar când proteinele sunt prezente chiar într-o concentraţie de numai 1/50 milioane face să nu se mai constate nici o scădere a tensiunii superficiale căci micelele proteice adsorb moleculele de oleat.

Serul sangvin iradiat cu radiaţii gamma (din sursa de cobalt, de exemplu), suferă o creştere a lui σ pentru doze relativ mici de radiaţii şi apoi o scădere către valori mari ale acestei doze.

Tensiunea superficială este în strânsă legătură şi cu fenomenul de embolie vasculară. Când o bulă gazoasă sau grasoasă pătrunde într-un vas sangvin atunci se manifestă şi forţele de tensiune superficială la interfeţele cu sângele ale acelei bule. Dacă presiunea dinamică este nulă sau foarte mică atunci bula rămâne la forma sferică (sau foarte aproape de această formă) şi forţele de tensiune superficială de pe cele două feţe îşi fac

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

echilibrul, astfel că bula rămâne staționară și se poate resorbi în timp. Când presiunea dinamică acționează, atunci bula se deformează și forțele de tensiune superficială nu-și mai fac echilibrul iar rezultanta lor poate bloca circulația sangvină.

În cazul urinii, cercetările (Perrin, Ammanon, Donnan, Doumer) au arătat că tensiunea superficială a acesteia, care în mod normal are valoarea de 70 dyn/cm, scade la bolnavii de icter datorită prezenței sărurilor biliare, până la 50 dyn/cm. Pe această constatare se bazează reacția Hay de identificare a urinelor icterice: floarea de sulf ce plutește la suprafața urinii normale cade la fundul vasului în cazul urinelor icterice cu valoare scăzută a tensiunii superficiale.

În cazul microorganismelor, scăderea valorii lui σ în mediul de cultură are efecte nefavorabile asupra dezvoltării microorganismelor respective. Efectul bacteriostatic și bactericid al alcoolilor este cu atât mai mare cu cât este mai mare tensioactivitatea lor (cu cât este mai lung lanțul de atomi de carbon). Experiențele au arătat că pneumococii și streptococii nu se pot dezvolta la valori ale tensiunii superficiale mai mici de 50 dyn/cm. Când s-a utilizat oleatul de sodiu pentru diminuarea tensiunii superficiale a mediului de cultură s-a găsit că valorile minime ce permit supraviețuirea sunt: 53 dyn/cm pentru pneumococ și 30 dyn/cm pentru streptococ.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

MODUL DE LUCRU

- Probele de ser (sau plasmă) se supun determinării de tensiune superficială, notându-se numărul de picături corespunzător, înainte de iradiere, N_i.

- Se determină densitatea fiecărei probe prin cântarirea unui volum cunoscut; se notează V_i şi m_i;

- Se iradiază probele cu doze diferite de radiaţii, menţinându-le în aceeaşi geometrie de iradiere pe durate de timp diferite, t_i.

- Se determină densitatea şi tensiunea superficială după iradiere, notându-se numărul de picături (corespunzător aceluiaşi volum), N'_i;

- Se determină numărul de picături N_0 pentru un volum corespunzător de apă distilată;

- Se evaluează tensiunea superficială a fiecărei probe, în raport cu cea a apei.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- Se face calculul erorilor, rezultatul final scriindu-se sub forma $\sigma \pm \Delta \sigma$

Notă. Pentru ca modificările induse de radiații în probe să fie semnificative din punct de vedere statistic, fiecare probă (ca și martorul) trebuie repetată de câteva ori iar apoi se aplică testul Student (cu ajutorul programelor MsExcel).

TABEL CU DATELE EXPERIMENTALE

Nr. crt.	Densitatea, ρ (Kg/m_3)	Volum (ml)	Masa (g)	Nr. picături N	Tensiunea superficială σ (N/m)
Apa					
P_1					
P'_1					

Notă: densitatea apei este de $1g/cm^3$ ($1000\ Kg/m^3$) iar tensiunea ei superficială de 73.10^{-3} N/m

ÎNTREBĂRI

1. Ce modificări structurale poate suferi serul sângvin sub acțiunea radiațiilor?
2. Menționați o aplicație a măsurătorilor de tensiune superficială în diagnosticul clinic.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3. Ce efect au proteinele într-o soluție apoasă de oleat de sodiu (substanță tensioactivă)?

ANEXA

Principiul metodei stalagmometrice de determinare a tensiunii superficiale

Volume egale de lichid (din lichidul de măsurat şi dintr-un lichid de referință, cu parametri cunoscuți) se lasă să se scurgă în picături dintr-un tub subțire. Desprinderea unei picături presupune că forța de greutate să echilibreze forța de tensiune superficială astfel că:

$$mg = 2\pi r\sigma$$

unde **r** este raza secțiunii transversale a tubului, **m** este masa picăturii iar σ este coeficientul de tensiune superficială (g-accelerația gravitațională). Dacă se notează cu V şi respectiv V_0 volumul unei picături din lichidul studiat şi respectiv din lichidul de referință atunci:

$$\rho V g = 2\pi r\sigma$$

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\rho_0 V_0 g = 2\pi r \sigma_0$$

unde ρ şi ρ_0 sunt densităţile corespunzătoare.

Numărând câte picături se obţin din volumul iniţial de lichid, în cele două cazuri, vom obţine N şi N_0:

$$NV = N_0 V_0$$

Din combinarea ultimelor trei relaţii se obţine:

$$\frac{N}{N_0} = \frac{V_0}{V} = \frac{\rho \sigma_0}{\rho_0 \sigma}$$

Deci:

$$\sigma = \sigma_0 \frac{N_0 \rho}{N \rho_0}$$

Dacă lichidul de referinţă este apa atunci mărimile cu indice "0" se referă la apă şi se vor lua din tabele.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

MODIFICAREA ACTIVITĂȚII ENZIMATICE SUB ACȚIUNEA RADIAȚIILOR IONIZANTE

SCOPUL EXPERIMENTULUI

Evidențierea efectelor radiațiilor gamma asupra activității enzimatice la nivelul plantulelor tinere din specii vegetale ierboase sau arboricole.

MATERIALE ȘI DISPOZITIVE NECESARE

- Sursă de radiații ionizante de mică intensitate
- Puieți de salcâm de 3-6 luni, crescuți în pepinieră sau în laborator sau plantule de grâu de 6-8 zile germinate în laborator pe suport de hârtie umectată sau în strat subțire de pământ
- Centrifugă cu până la 5000 rotații pe minut
- Plită electrică
- Balanță analitică
- Mojar de mici dimensiuni
- Eprubete, pipete, baloane cotate
- REACTIVI: (1) soluție de fosfat disodic 0,1 M; (2) soluție tampon de fosfat de sodiu 0,01M cu pH =7; (3) soluție de apă oxigenată 3%; (4) soluție acid sulfuric 10 %; (5) soluție de iodură de potasiu 10%;

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(6) soluție de molibdat de amoniu 1%; (7) soluție de amidon 1%; (8) soluție de tiosulfat de sodiu 0,02M.

FENOMENOLOGIE

Proteinele expuse acțiunii radiațiilor ionizante pot fi afectate la nivelul structurii lor primare (succesiunea lanțurilor de aminoacizi uniți prin legături covalente) sau a structurilor superioare (realizate prin interacțiuni mai slabe, de natură fizică, cum sunt legăturile de hidrogen, forțele ionice, legăturile de tip Van der Waals) care le conferă și funcții specifice în celulă.

Ca urmare a ruperii legăturilor covalente de la nivelul structurii primare, proteinele se desfac în radicali liberi ce tind să se recombine între ei dar și cu alte sisteme atomice din celulă, destabilizând mediul intracelular (prin afectarea calitativă și cantitativă a reacțiilor biochimice).

Prin ruperea legăturilor de hidrogen și a celorlalte interacțiuni de natură fizică dintre porțiunile de lanțuri de aminoacizi, proteinele se pot denatura, adică își pot pierde activitatea enzimatică - de control a reacțiilor biochimice din celulă (reacții enzimatice). Un aspect deosebit de important pentru biofizica celulară îl constituie denaturarea pompelor ionice ATP-azice - complexe proteice cu rol de hidroliză a macromoleculelor macroergice de ATP pentru eliberarea energiei necesare efectuării transportului activ al ionilor prin membranele celulare.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Acțiunea radiațiilor asupra componenților fundamentali ai proteinelor - aminoacizii - a fost studiată mult prin intermediul analizei de rezonanță paramagnetică electronică, deoarece absorbția energiei de la radiațiile ionizante produce apariția de radicali liberi, paramagnetici. Aceştia au fost evidențiați în cazul glicinei, alaninei, valinei, histidinei şi aminocizilor sulfurați (cistina şi cisteina), şi a altor aminoacizi. Pentru a descrie dependența de timpul t, de iradiere (implicit de doza de radiații absorbită, D) a numărului N, de radicali eliberați prin iradierea cisteinei a fost propusă o relație de forma:

$$N = a \ln t + bt$$

unde a şi b sunt constante specifice substanței.

Curbele efect-doză au o alură exponențială dar cu tendință de saturație pentru majoritatea aminoacizilor studiați, ca urmare a concurenței a două fenomene: formarea de radicali liberi (cu rata de n radicali pe unitatea de doză absorbită) şi recombinarea acestora (cu constanta de viteză α). Astfel, ecuația diferențială a procesului este de forma:

$$\frac{dN}{dD} = n - \alpha N$$

iar soluția obținută prin integrare este:

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

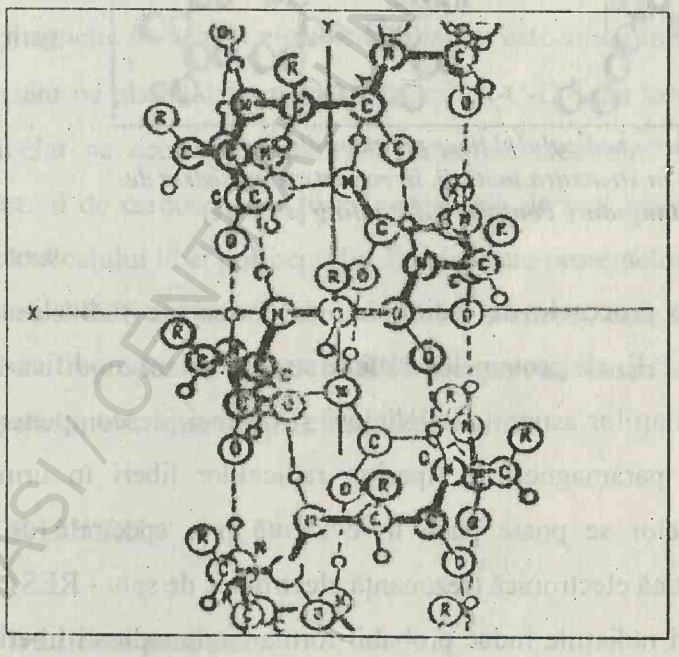
$$N = \frac{n}{\alpha}\left(1 - e^{-\alpha D}\right)$$

unde se evidențiază limita de saturare pentru doze mari:

$$N_{max} = \frac{n}{\alpha}$$

Dacă luăm în considerare expresia lui *Nmax*, corespunzător unei doze suficient de mari, atunci se poate scrie:

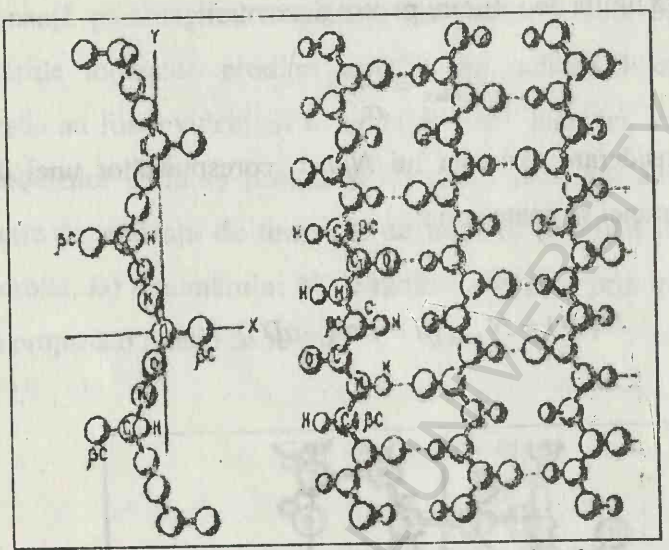
$$N(D) = N_{max}(1 - exp(-\alpha D))$$



Structura radicalului liber polipeptidic generat de radiațiile ionizante

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Interpretarea unei astfel de relații relevă faptul că din cele două fenomene concurente (formarea de radicali liberi şi recombinarea acestora) domină cel care are sensul pozitiv în raport cu creşterea mărimii fizice aflată sub diferențială. Deci, la doze suficient de mari procesele de recombinare sunt net depăşite de procesele de radioliză - de formare a radicalilor liberi. În spectrele R.P.E. ale proteinelor iradiate se evidențiază modificările datorate acțiunii radiațiilor asupra glicilglicinei şi cistinei (descompunerii acestora în radicali paramagnetici). Apariția radicalilor liberi în urma iradierii biomoleculelor se poate pune în evidență prin spectrele de rezonanță paramagnetică electronică (rezonanță electronică de spin - RES).



Orientarea radicalului liber polipeptidic indus de radiații în structura mătăsii, în raport cu un sistem de axe rectangulare conform lui Pauling şi Correy

Deşi radiațiile induc probabil formarea de radicali liberi la nivelul tuturor aminoacizilor, compararea spectrelor RES ale diverselor proteine

cu cele ale aminoacizilor a evidențiat faptul că cei mai stabili radicali se obțin de la doi aminoacizi: glicilglicina şi cistina. Electronii impari produşi la alți aminoacizi ar putea migra de-a lungul lanțului peptidic (care realizează legăturile între aminoacizii constituienți) către glicină şi cisteină unde ar fi reținuți ca într-o capcană.

Astfel, de exemplu, spectrul glicinglicinei este foarte asemănător cu cel al mătăsii, despre care se ştie că are un conținut mare de glicină - de 48%. Un astfel de spectru RES este caracterizat de un dublet care este atribuit interacțiunii electronului impar cu un proton. În general, s-a găsit că spectrele poliglicinelor sunt foarte asemănătoare cu ale glicinei. Momentul magnetic de spin al electronului impar este situat într-un orbital π perpendicular pe planul determinat de atomii N-C-C $^{\bullet}$ sau într-un orbital *p* perpendicular pe acest plan (punctul semnifică electronul impar care apare la atomul de carbon respectiv). În desenele de mai sus sunt redate diagramele radicalului liber polipeptidic din structura proteinelor iradiate.

Spectrul RES al cistinei este un spectru asimetric care se regăseşte destul de bine reprodus în spectrele RES ale părului uman sau animal, unghiilor, penelor etc., care conțin circa 10% cistină.

MODUL DE LUCRU

- **Iradierea probelor**

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- Puieții, aflați în vase de sticlă, sunt iradiați prin așezarea fiecărui vas deasupra unei surse de radiații de mică intensitate (de exemplu o sursă de Cobalt cu activitatea de ordinul zecilor de mCi).
- Durata iradierii va fi de ordinul orelor (0,5 h; 1,0 h; 1,5 h; 2,0 h; 4,0 h etc.).
- La cel puțin o zi după terminarea iradierii (pentru fixarea efectelor) se poate preleva țesut pentru dozarea catalazei.

□ **Extracția și determinarea activității catalazei**

Pentru extragerea din proba studiată se prelevă o cantitate de 0,1-0,2g material care se omogenizează (mojarează) în 3 ml soluție (1) -fosfat disodic 0,1 M.

- Timp de 60 minute se agită cu o baghetă de sticlă din 10 în 10 minute.
- Apoi se centrifughează 15 minute la 3000 rot/minut. *Supernatantul separat reprezintă sursa de enzimă.*

În 2 flacoane conice de 100 ml se măsoară câte 6 ml soluție (1)-fosfat disodic cu pH 7 și câte 0,1 ml (acest volum poate fi mărit dacă avem de-a face cu un conținut mic de enzimă) extract enzimatic.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- Conținutul primului flacon va servi de martor şi se fierbe 3-5 minute pentru inactivarea catalazei. Se răceşte apoi cu apă de robinet.
- În ambele flacoane se adaugă 0,2 ml soluție (3) -apa oxigenată. După agitarea conținutului flacoanele se lasă în repaus la temperatura de 20 grade Celsius timp de 5 minute.
- Acțiunea catalazei asupra apei oxigenate se întrerupe prin introducerea în fiecare flacon a câte 5 ml din soluția (4) -acid sulfuric 10%.
- Se adaugă câte 5 ml din soluția (5) - iodură de potasiu şi câte 5 picături din soluția (6) -molibdat de amoniu, agitând amestecul.
- Iodul eliberat prin reacția dintre apa oxigenată nedescompusă enzimatic şi iodura de potasiu se titrează cu soluție (8)-tiosulfat de sodiu până la atingerea colorației galben pal.
- Apoi se adaugă 2-3 picături soluție (7) -amidon şi se continuă titrarea până când dispare coloraţia gălbuie.

- **Calculul rezultatelor**

Cantitatea de apă oxigenată descompusă sub acțiunea catalazei se află ca diferența dintre rezultatele titrării martorului şi probei. Dacă A este activitatea enzimatică a extractului atunci:

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$X = (V - v)F.0{,}034\ ,\ X_1 = \frac{X.vol}{t.vol'.w}\ ,\ A = X_1 / 0{,}034$$

unde: *V* şi v sunt volumele de tiosulfat corespunzătoare martorului şi probei, F este factorul soluției de tiosulfat, *vol* este volumul de fosfat disodic (aici 3 ml), *vol'* este volumul de extract utilizat la titrare (aici 0,1 ml), *t* este timpul de 5 minute iar *w* este masa cântărită (aici 0,1 g). Unitatea de măsură a activității catalazei este acea cantitate de enzimă care descompune într-un minut un micromol de apă oxigenată (0,034 mg).

Rezultatele obținute pentru fiecare din cele cinci replici ale fiecărei probe precum şi pentru cele cinci replici ale martorului se mediază, se tabelează şi se reprezintă grafic.

TABEL CU REZULTATE EXPERIMENTALE

proba	V	v	w	vol	vol'	T	A
1							
2							
3							

ÎNTREBĂRI

1. Ce efecte pot avea radiațiile ionizante asupra aminoacizilor din componența proteinelor?
2. Cum se reflectă în spectrele RES iradierea proteinelor?

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3. Cum este orientat orbitalul *p* al electronului impar din radicalul peptidic?

4. Ce rol are catalaza în organismul vegetal?

5. Ce modificări poate suferi această enzimă după iradiere?

6. Ce metodă de laborator se poate utiliza pentru determinarea activității catalazei?

ANEXA

Principiul metodei de determinare a activității catalazei

Apa oxigenată rămasă nedescompusă după un timp de incubație cu catalaza oxidează iodura de potasiu:

$$H_2O_2+2KI+H_2SO_4=2H_2O+K_2SO_4+I_2$$

Iodul eliberat din reacție este titrat cu o soluție de tiosulfat de Na de concentrație cunoscută în prezența amidonului (indicator):

$$I_2+2Na_2S_2O_3=2NaI+Na_2S_4O_6$$

În paralel cu proba se realizează un martor (pe baza enzimei inactivate de la începutul incubației) care este diferența dintre numărul de mililitri de tiosulfat de sodiu consumat la titrarea apei oxigenate în martor și numărul

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

de mililitri de tiosulfat consumat la titrarea apei rămasă nedescompusă în probă - reflectă activitatea catalazei din proba analizată.

Notă. Pentru ca modificările induse de radiații în probe să fie semnificative din punct de vedere statistic, fiecare probă (ca şi martorul) trebuie repetată de câteva ori iar apoi se aplică testul Student (cu ajutorul programelor MsExcel).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ACIZII NUCLEICI ŞI RADIAŢIILE IONIZANTE

SCOPUL EXPERIMENTULUI

Studierea cantitativă a influenţei radiaţiilor ionizante la nivelul conţinutului mediu de acizi nucleici din celulele unor organisme vegetale expuse acţiunii radiaţiilor ionizante în faze ontogenetice timpurii.

MATERIALE ŞI DISPOZITIVE NECESARE

- Sursă de radiaţii ionizante de mică intensitate
- Plantule de secară de 6-8 zile germinate şi crescute în laborator sau puieţi de stejar de 3-6 luni, crescuţi în pepinieră sau în laborator
- Spectrofotometru de absorbţie în ultraviolet şi cuve de cuarţ
- Centrifugă cu până la 5000 rotaţii pe minut
- Plită electrică
- Balanţă analitică
- Mojar de mici dimensiuni
- Acid percloric
- Eprubete, pipete, baloane cotate

FENOMENOLOGIE

Acţiunea radiaţiilor ionizante asupra acizilor nucleici nu este pe deplin elucidată căci se traduce în efecte deosebit de complexe.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1. Acțiunea radiațiilor asupra acizilor nucleici

- Studiile efectuate *in vitro* (cu acizi nucleici extraşi din celule) asupra acizilor nucleici în stare uscată sau uşor umedă (de exemplu până la 10 % apă) relevă predominanța efectului *direct* asupra celui indirect.

Efectul direct poate să însemne:

- afectarea bazelor azotate de pe cele două lanțuri fosfoglucidice;
- afectarea unuia sau ambelor lanțuri fosfoglucidice.

Moleculele de acizi nucleici fiind mai apropiate unele de altele, ruperea lanțurilor poate fi urmată de unirea pe diferite direcții a porțiunilor de lanț apărute iar la doze mai mari de radiații pot să apară chiar forme de gel. Spre deosebire de mediul umed, în cazul iradierilor asupra acizilor în stare uscată, oxigenul nu influențează în mod semnificativ rezultatele iradierilor.

- Studiile efectuate asupra acizilor nucleici în soluție diluată au arătat predominanța *efectului indirect* în sensul că efectul radiațiilor este datorat în special acțiunii radicalilor liberi rezultați din radioliza apei - fenomen de disociere determinat de absorbția energiei radiațiilor în moleculele de apă.

Efectul indirect poate, de asemenea, să conducă la modificarea bazelor azotate sau la afectarea structurii primare a lanțurilor fosfoglucidice.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Spre deosebire de acțiunea radiațiilor ionizante, se apreciază că acțiunea radiațiilor ultraviolete este mai frecventă la nivelul bazelor azotate, în special cele pirimidinice.

În prezența oxigenului, bazele azotate din structura primară a acizilor nucleici sunt modificate sau chiar distruse - disociate în alte molecule în procesul de formare de peroxizi.

În lipsa oxigenului, efectele iradierilor soluțiilor apoase sunt de 2-3 ori mai mici şi constau fie în alterarea bazelor azotate fie, chiar, în desprinderea lor de pe lanțurile fosfoglucidice. De pe lanțul fosfoglucidic se pot desprinde grupările anorganice fosfat sau se poate întrerupe acest lanț; ruperea unuia din lanțuri duce la creşterea flexibilității moleculei în timp ce ruperea ambelor lanțuri în puncte aproximativ opuse poate provoca sciziunea moleculei. Acest fenomen molecular, se reflectă la scară celulară în perturbarea informației genetice conținută în celulă.

Cele mai semnificative modificări fizico-chimice care decurg de aici constau în diminuarea masei moleculare medii şi a vâscozității intrinseci, reflectate în măsurători de difuzie a luminii, de constantă de sedimenatre, de birefringență etc. Un argument experimental important în favoarea dominanței efectului indirect al radiațiilor asupra acizilor nucleici în soluție apoasă este faptul că prezența ionilor de iod în soluții diluate ale acizilor nucleici duce la micşorarea radiosensibilității acestora, căci ionii de iod pot contracara acțiunile radicalilor liberi proveniți de la radioliza

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

apei. Acțiunea protectoare a ionilor de iod este aproape totală la soluții de până la 0,1% concentrație de acizi nucleici.

Dacă această concentrație este mare, de exemplu 20%, atunci protecția iodului nu se răsfrânge decât asupra unui procentaj mic de molecule de acid nucleic, majoritatea acestora fiind afectate de efectul indirect al radiațiilor exercitat prin intermediul radicalilor proveniți de la radioliza apei.

2. Repararea leziunilor moleculelor de ADN

Celulele prezintă capacitatea de a repara unele leziuni suferite de moleculele de *ADN*.

Mecanismele de restaurare elimină unele leziuni induse de radiații sau reconstituie structura originală a *ADN*-ului, conducând, la nivel celular, la refacerea viabilității celulei; creşterea fracțiunii (proporției) de supraviețuire este, adesea, o măsură a gradului de funcționare a acestor mecanisme. Totuşi supraviețuirea celulei nu implică, neapărat, restaurarea completă a leziunilor *ADN* - ului deoarece există aberații cromosomiale sau mutații genetice care sunt compatibile cu supraviețuirea. De aceea este convenabil să se facă următoarea clasificare:

- mecanisme de restaurare fără erori, de exemplu mecanismele de excizie-resinteză, transalchilare sau fotorestaurare în cazul radiațiilor ultraviolete;

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- mecanisme de restaurare care pot lăsa unele erori şi, implicit, o rată crescută a aberaţiilor cromosomiale (mecanismele SOS de la bacterii); aceste mecanisme sunt activate mai ales după ce primele menţionate mai sus ajung la saturare, de exemplu când doza sau debitul dozei sunt mari (ceea ce explică creşterea efectului mutagen pe unitatea de doză la creşterea dozei sau debitului dozei).

Reparaţiile moleculei de *ADN* se derulează sub controlul unor gene care guvernează restaurarea leziunilor prin biosinteza unor enzime. Unele mecanisme de reparare acţionează într-o singură etapă (fotorestaurarea şi transalchilarea) în timp ce altele decurg în mai multe etape şi implică mai mult decât o singură enzimă (excizare-resinteză). Există enzime care nu sunt specifice fenomenelor de restaurare ci sunt implicate şi în biosinteza normală a *ADN* - ului (*ADN* -polimeraza, ligaza).

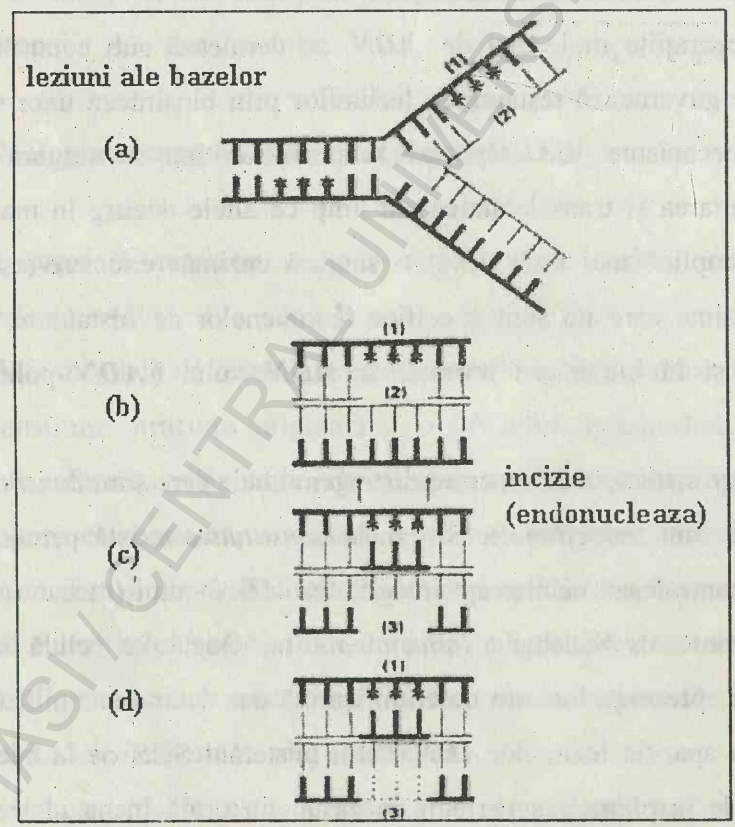
Între sistemele de reparare distingem unele care sunt *constitutive* şi altele care sunt *inducţionale*. Sistemele *constitutive* există permanent în celule şi controlează neîntrerupt integritatea *ADN* - ului (mecanismele de excizie-resinteză). Sistemele *inducţionale* nu există în celulă în mod normal sau prezenţa lor este nesemnificativă dar devine semnificativă ca răspuns la apariţia leziunilor *ADN* - ului (sistemul SOS de la bacterii şi fotoliaza de la plantele superioare, aceasta din urmă în cazul leziunilor produse de radiaţiile ultraviolete).

BCU IAŞI CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

Vom prezenta pe scurt unul dintre mecanismele care sunt întâlnite la organismele superioare (animale şi plante).

- Mecanismul de excizie resinteză

Este principalul mecanism de restaurare care poate repara leziunile de pe un singur lanţ şi care acţionează în moleculele care nu sunt în faza de



Repararea leziunilor moleculei de ADN

replicare.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

O leziune a unui lanț de *ADN* este recunoscută, extrasă, iar segmentul respectiv este resintetizat folosind ca tipar un lanț de *ADN* complementar. Diferitele stadii ale restaurării implică controlul exercitat de diferite enzime.

Astfel, pentru înlăturarea unor baze azotate afectate de radiații acționează *glicoliaza*, o enzimă care rupe legăturile bazei respective cu molecula de dezoxiriboză (molecula glucidică specifică *ADN* -ului). Apoi acționează *endonucleaza* care rupe legătura bazei cu lanțul fosfoglucidic.

Repararea unui singur lanț de *ADN* afectat se petrece rapid dar scade exponențial ca o funcție de timp. Jumătate din leziunile de acest fel produse la o iradiere se repară în primele 15 minute dacă fragmentele de lanț distruse nu depășesc 30 de baze azotate. Pentru dimensiuni mai mari ale fragmentelor de lanț distruse restaurarea poate fi mult mai lentă, durând câteva ore sau chiar mai mult.

În etapa următoare acționează *exonucleaza* care elimină segmentul de lanț cu leziunea şi, în final acționează *polimeraza* şi o *ligază* care determină resinteza (polimerizarea) fragmentului lipsă şi atașarea lui la locul vacant.

MODUL DE LUCRU

- Materialul biologic, plantulele de graminee sau puieții de stejar (care sunt mai rezistenți decât puieții altor specii arboricole la transferarea

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

din teren în laborator) se expun la radiațiile emise de o sursă de intensitate mică prin amplasarea vasului de sticlă deasupra sursei la o distanță convenabilă.

- Timpul de expunere se poate alege de ordinul orelor, de exemplu 1 oră, 2 ore, 4 ore, 8 ore.
- Momentul investigației spectrale asupra conținutului mediu de acizi nucleici se alege astfel ca, de la încetarea ultimei expuneri, să se scurgă un minimum de 24 de ore - interval comparabil cu durata unui ciclu celular iar modificările induse de radiații să se poată fixa la nivel celular.
- Pentru prepararea probelor, din fiecare plantă se prelevă fragmente de frunză - câte 100-300 mg din fiecare frunză - care se mărunțesc și se amestecă. Apoi se prelevă o cantitate de 20-50 mg din acest amestec și se mojarează cu un volum de 3 ml de acid percloric după care se introduce într-o eprubetă de dimensiuni corespunzătoare.
- Eprubetele corespunzătoare martorului și probelor se mențin timp de jumătate de oră pe o baie de apă la temperatura de fierbere. În acest mod se realizează extracția selectivă a acizilor nucleici.
- După răcire eprubetele se supun centrifugării la turația de 5000 cicli pe minut timp de zece minute.
- Supernatantul din fiecare eprubetă se extrage cu ajutorul unei pipete și se transferă într-o cuvă de cuarț pentru citirea spectrofotometrică (metoda Spirin).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- Se determină extincția luminii la lungimile de undă de 270 nm și 290 nm (E(270) și E(290)) față de acidul percloric.
- Se calculează conținutul mediu de acizi nucleici cu relația:

$$\langle AN \rangle = \frac{E(270) - E(290)}{0,19} \cdot \frac{v}{m}$$

unde **m** este masa de material vegetal, **v** este volumul de solvent utilizat la extracție iar 0,19 este o constantă de omogenizare a dimensiunilor. Se tabelează rezultatele.

- Se reprezintă grafic valorile obținute și se interpretează.

TABEL CU DATE EXPERIMENTALE

Proba	Timpul de expunere	E (270)	E(290)	*m* (mg)	*v* (ml)	$\langle AN \rangle$

ÎNTREBĂRI

1. Ce efecte poate avea iradierea unor probe "uscate" de *ADN*? Dar iradierea unor probe în soluție apoasă?

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2. Ce tipuri de leziuni se pot induce în molecula de *ADN* de către radiațiile ionizante?

3. Ce se înțelege prin restaurarea efectelor radiațiilor?

4. Cum se evaluează conținutul total de acizi nucleici dintr-o probă vegetală?

Notă. Pentru ca modificările induse de radiații în probe să fie semnificative din punct de vedere statistic, fiecare probă (ca și martorul) trebuie repetată de câteva ori iar apoi se aplică testul Student (cu ajutorul programelor MsExcel).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

DETERMINAREA NIVELULUI RADIOACTIVITĂȚII DIN COMPONENTELE BIOTICE ŞI ABIOTICE ALE MEDIULUI ÎNCONJURĂTOR

SCOPUL EXPERIMENTULUI

Determinarea comparativă a radioactivității din depuneri atmosferice şi din vegetație, în conformitate cu procedeele standardizate.

MATERIALE ŞI DISPOZITIVE NECESARE

- Sistem de detecție a radioactivității beta-globale (contor Geiger-Müler şi numărător de impulsuri)
- Spectrometru gamma cu minimum 400 de canale
- Probe de aerosoli şi de vegetație preparate conform metodelor de mai jos.

FENOMENOLOGIE

Existența fenomenului de radioactivitate are implicații majore asupra biosistemelor de pe planeta noastră. Dezvoltarea energeticii

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

nucleare fiind însoțită de semnale de alarmă tot mai dese relativ la efectele de perturbare a echilibrelor din lumea vie, în prezent se acordă o atenție din ce în ce mai mare supravegherii nivelului de radioactivitate în diferitele componente ale mediului înconjurător.

1. Radioactivitatea naturală şi cea artificială

O sursă importantă de radioactivitate în elementele biotice şi abiotice ale mediului înconjurător o constituie chiar *radioactivitatea naturală*. O primă categorie de de radionuclizi naturali include pe cei cu timpi de înjumătățire mari (peste 10^8 ani), rămaşi, se pare, încă din procesele cosmice contemporane cu formarea sistemului nostru solar. Între aceştia se numără K^{40}, Rb^{87}, U^{235}, U^{238}, Th^{232}.

O a doua categorie se referă la radionuclizii cosmogeni, rezultați din interacțiunile radiației cosmice cu atmosfera, între care, mai importanți sunt: H^3 şi C^{14}. O a treia categorie se referă la radionuclizii descendenți ai celor din prima categorie, adică U^{234}, Th^{230}, Ra^{226}, Pb^{210}, Po^{210} etc, cu timpi de înjumătățire cu ordine de mărime comparabile cu a celor din categoria a doua, după cum rezultă şi din tabelul următor.

Radioactivitatea artificială are ca principale surse: testările de arme nucleare, recircularea combustibililor din centralele atomo-energetice, depozitele de deşeuri radioactive, accidentele nucleare.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

		$T_{1/2}$ (ani)	Radioemisie
Radionuclizi primordiali	K^{40}	$1,3 .10^{8}$	Beta/gamma
"	Rb^{87}	$6,2 .10^{10}$	Beta
"	U^{235}	$7,0 .10^{8}$	Alfa
"	U^{238}	$4,5\ 10^{9}$	Alfa
"	Th^{232}	$1,4 .10^{10}$	Alfa
Radionuclizi cosmogeni	H^{3}	$5,7\ 10^{3}$	Beta
"	C^{14}	$1,6\ 10^{3}$	Beta
Radionuclizi de filiație	Ra^{226}	$1,6\ 10^{3}$	Alfa/gamma
"	Pb^{210}	22	Beta/gamma
"	Po^{210}	0,4	Alfa

Cele mai importante explozii nucleare atmosferice pentru testarea armamentelor nucleare au avut loc în anii 1954-1958 şi 1961-1962. Compuşii radioactivi rezultaţi au format depuneri atmosferice de radioactivitate semnalate la nivelul troposferei şi stratosferei din ambele emisfere ale globului.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

S-au efectuat numeroase studii asupra distribuției spațio-temporale a depunerilor atmosferice de Sr^{90}, H^3, C^{14}, Cs^{137}, Pu^{239}, Pu^{240}.

Centralele atomo-energetice totalizau la începutul anului 1990 un număr de 426 reactori nucleari în funcțiune şi 96 în construcție, repartizați în 30 de state: 111 în SUA, 56 în Franța, 46 în spațiul exsovietic, 41 în Japonia, 37 în Marea Britanie etc.

Dacă, după 1962, interzicerea experimentărilor exploziilor nucleare atmosferice a dus la scăderea fondului de radioactivitate atmosferică, în schimb, accidentele nucleare au dus la creşteri semnificative ale acestuia. Cel mai grave consecințe le-au avut exploziile accidentale de la Sellafield (Windscale)-Marea Britanie (1957), Celiobinsk-URSS (1957), Three Mile Island-SUA (1979) şi Cernobîl-URSS (1986). Referitor la cel mai recent dintre acestea, se evaluează că, de exemplu, numai din cauza radioizotopului Cs^{137}, în oceanele emisferei nordice depunerile atmosferice au dat o creştere de 1% a fondului de radioactivitate. Pentru urmărirea circulației compuşilor radioactivi se ține seama şi de rolul însemnat pe care îl are metabolizarea lor la nivelul organismelor vii. Concentrațiile de radionuclizi din plante şi animale sunt adesea mult superioare celor din componentele abiotice ale mediului înconjurător. Studiile ce se efectuează cu atenție din ce în ce mai sporită urmăresc atât biocinetica diferiților radionuclizi în organismele vii cât şi transferul acestor elemente de-a lungul lanțurilor trofice.

BCU IAŞI / CENTRALA UNIVERSITARĂ

Iată, spre exemplu, concentrațiile de Cs^{137} în componentele abiotice și biotice de la litoralul Mării Negre (după Bologa, A., 1990, Monitoring of marine water, sediment and biota radioactivity in samples from the Romanian sector of the Black Sea by means of gamma spectrometry, Press commun., 2nd IAEA/CRP Meeting MARDOS, Roskilde-Denmark).

Tabel cu concentrațiile de Cesiu din elemente biotice și abiotice marine

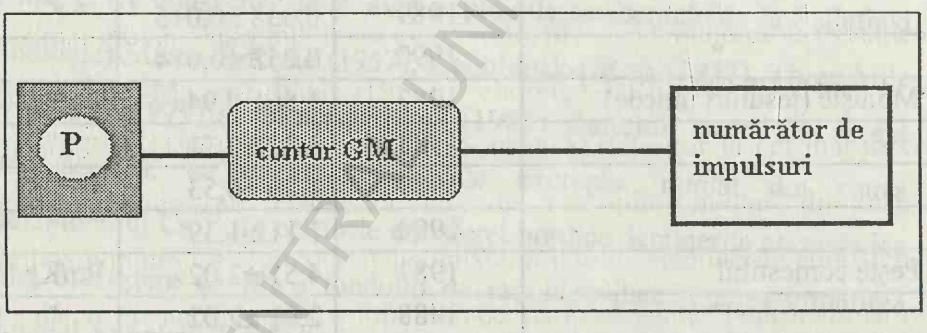
Apa de mare la suprafață	1987	0,078± 0,025	Bq/l
"	1988	0,060 ±0,020	"
"	1989	0,058 ±0,015	"
"	1990	0,052 ±0,014	"
Moluște (țesuturi umede)	1987	1,56± 0,94	Bq/Kg
"	1988	1,37 ±0,71	"
"	1989	1,39 ±0,53	"
"	1990	1,11± 1,39	"
Pește comestibil	1987	4,51 ±2,02	Bq/Kg
"	1988	2,91 ±2,02	"
"	1989	3,25± 0,94	"
"	1990	2,93 ±1,06	"

În cele ce urmează sunt prezentate două variante de determinare a radioactivității din probe de interes biologic.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2. Instalații de măsură

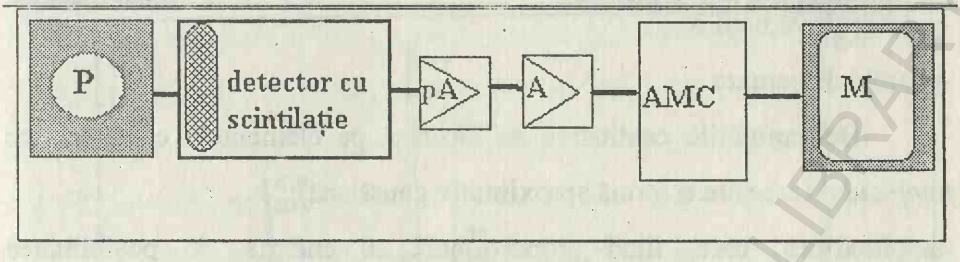
Pentru determinarea radioactivității beta globale, instalația de măsură cuprinde: camera de plumb pentru amplasarea probei, detectorul de radiații (contor Geiger Müler cu fereastră sau montajul în anticoincidență a doi contori Geiger Müler pentru realizarea unui fond de radiații redus) și numărătorul de impulsuri. Calculul activității probelor se face prin compararea vitezei de numărare a impulsurilor detectate de la o probă de mediu cu viteza de numărare a impulsurilor de la o probă etalon, cu activitate cunoscută.



Sistem de detecție a radioactivității beta globale

Pentru determinarea radioactivității gamma a unor anumiți izotopi se utilizează instalația având schema bloc de mai jos, unde: P-proba, pA-preamplificator, A-amplificator, AMC-analizor multicanal, M-monitor.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Sistem de spectrometrie gamma multicanal

Detectorul poate fi un cristal scintilator de iodură de sodiu NaI (Tl) activată cu taliu sau un detector cu semiconductor. Spectrul energetic al radiațiilor gamma ce se analizează apare ca un spectru de amplitudini ale impulsurilor de răspuns. Pe monitorul instalației acest spectru apare ca având o formă complexă chiar pentru radiații despre care se știe că sunt monoenergetice, deoarece se manifestă o gamă variată de interacțiuni ale radiației respective cu cristalul detector (cele mai importante sunt efectul fotoelectric, efectul Compton și generarea de perechi electron-pozitron). În spectrul de amplitudini se pot vedea:

-semnalul de amplitudine maximă sau picul de absorbție maximă sau *fotopicul*;

-zona distribuției Compton;

-picurile de scăpare;

-picurile de retroîmprăștiere;

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

-picurile de radiații X;

-picurile de sumare.

Determinările cantitative se bazează pe elementele caracteristice *fotopicului* (care are o formă aproximativ gaussiană):

-amplitudinea, care, fiind proporțională cu energia, dă posibilitatea calibrării energetice a instalației;

-aria, care este proporțională cu activitatea sursei de radiație;

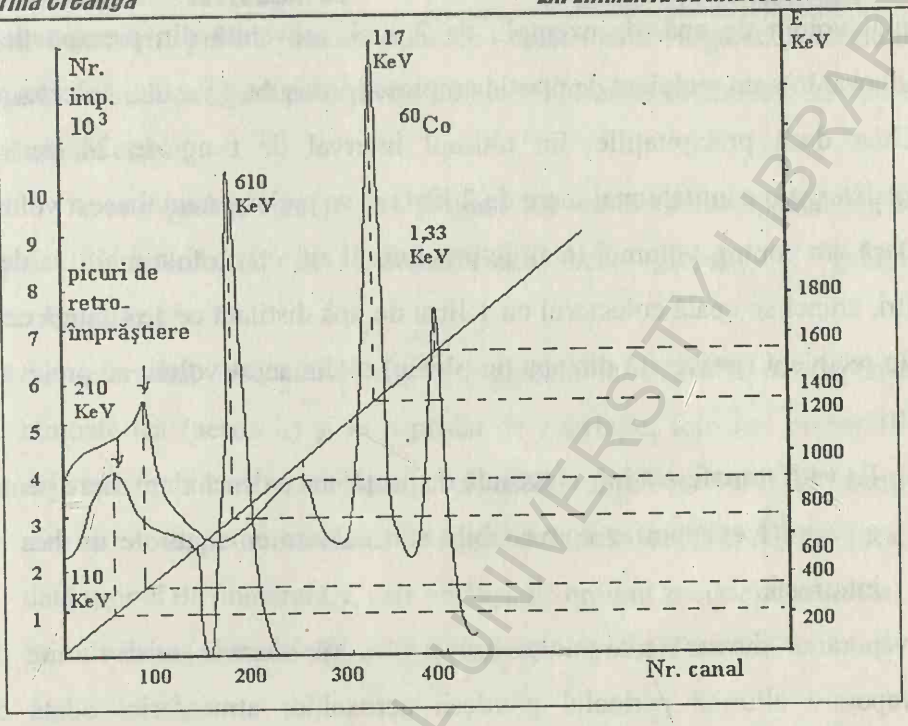
-semilărgimea, adică lărgimea măsurată la jumătatea înălțimii (amplitudinii) fotopicului şi care defineşte puterea de rezoluție a instalației spectrometrice.

- *Calibrarea instalației spectrometrice* presupune utilizarea unor surse etalon de radiații gamma la care energiile cuantelor emise se cunosc cu precizie mare din măsurătorile absolute (cum ar fi difracția Bragg pe cristale).

Ca urmare, procedeul de măsură prezentat aici este un procedeu relativ.

Iată cum se poate obține dreapta de etalonare (dependența liniară dintre energiile cuantelor gamma, proporționale cu amplitudinea picurilor exprimată în număr de impulsuri şi de numărul canalului). În exemplul prezentat s-au folosit radioemisiile gamma ale Cesiului 137 şi Cobaltului 60; cele două surse s-au adus pe rând în fața detectorului. Pentru obținerea fiecărui spectru se aşteaptă circa 1000 secunde.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Interpretarea picurilor obținute la spectrometrul gamma multicanal cu detector cu scintilație

MODUL DE LUCRU

▫ Pregătirea probelor

- *Proba de depuneri atmosferice* (aerosoli) se colectează de pe un vas tronconic (diametrul mare, de exemplu, de 60 cm) prin intermediul

BCU MS / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

unui volum de apă, de exemplu de 2 litri, provenită din precipitații și adunată într-un recipient de plastic amplasat dedesubtul vasului colector. Chiar dacă precipitațiile din ultimul interval de timp de 24 de ore totalizează o cantitate mai mare de 2 litri, se va preleva numai acest volum. Dacă din contra, volumul total de precipitații colectat a fost mai mic de 2 litri, atunci se spală colectorul cu 1 litru de apă distilată ce se adaugă celei din recipient (provenită din apa de ploaie) și din acest volum se prelevă 2 litri.

- Ea va fi transferată într-o capsulă de porțelan cu deschidere mare pentru a permite evaporarea convenabilă sub căldura emanată de un bec de infraroșu.

Evaporarea durează mai multe ore pentru că vitezele relativ mici de evaporare elimină pericolul pierderii aerosolilor atmosferici odată cu ridicarea vaporilor de apă.

- Rezidiul de la evaporarea apei se trece integral într-un cuptor la circa 400^0C pentru arderea tuturor substanțelor organice. Rezidiul de la calcinare se transferă pe un suport adecvat pentru operația de detecție care urmează (de exemplu o tăviță de aluminiu cu diametrul de câțiva centimetri) pe care se fixează cu ajutorul a câteva picături de etanol.
- *Proba de vegetație* se prepară din circa 100 g de iarbă care se presează sub forma unui cartuș cilindric cu diametrul de circa 7 cm. Se supune

BCU "ASTRA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

apoi calcinării pentru descompunerea substanțelor organice. Rezidiul obținut se trece integral pe o tăviță de aluminiu unde se fixează cu câteva picături de etanol.

Aceste probe, care se pot prepara într-un laborator specializat, se supun determinărilor de radioactivitate beta globală şi gamma spectrometrării.

- Se determină radioactivitatea beta-globală la o probă de depunere atmosferică (aerosoli) şi la o probă de vegetație, folosind preparatele deja existente care se amplasează pe rând în fața contorului GM pentru a se citi apoi, pe numărătorul de impulsuri, valorile N_1 şi N_2 (de fiecare dată timpul de numărare, t, este acelaşi, de ordinul zecilor de secunde).
- Se calculează mărimile Q_1 şi Q_2 (viteze de numărare):

$$Q_1 = \frac{N_1}{t} \qquad Q_2 = \frac{N_2}{t}$$

- Se determină în mod analog, numărul N de impulsuri pentru fond, în lipsa oricărei surse de radiații; timpul de numărare este tot t, de mai sus;
- Se calculează mărimea F (viteza de numărare pentru fond):

$$F = \frac{N}{t}$$

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- Fiind dată viteza minimă detectabilă cu instalația folosită, R_m (valoare înscrisă pe instalație), se compară acest R_m cu R_1 ($R_1=Q_1-F$) și cu R_2 ($R_2=Q_2-F$);

-dacă $R > R_m$ atunci activitățile probelor se evaluează prin formula:

$$\Lambda_1 = \frac{R}{\Lambda} \cdot \frac{V_{col}}{V_{evap}} \cdot \frac{1}{St'}$$

-dacă $R < R_m$ atunci se aplică formula:

$$\Lambda_2 = \frac{R_m}{\Lambda} \cdot \frac{V_{col}}{V_{evap}} \cdot \frac{1}{St'}$$

în care:

- Λ este activitatea cunoscută a probei etalon (înscrisă pe aceasta);

-V_{col} este volumul (în litri) de precipitații colectate în recipientul de sub vasul tronconic;

-V_{evap} este volumul (în litri) supus evaporării (2 litri);

-t' este timpul de colectare a probei (în zile); o zi;

-S este suprafața colectorului.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Se vor obține deci două valori A_1 și A_2 pentru cele două probe de depunere atmosferică și respectiv de vegetație;

- Se determină *activitatea gamma* provenită din izotopii Cs^{137} și K^{40}. Pentru fiecare probă se așteaptă circa 60.000 secunde pentru stabilizarea spectrului pe ecranul-monitor (în funcție de etalonare). Picul corespunzător lui Cs^{137} apare pe canalul 58 (la un spectrometru cu 400 canale) iar cel al izotopului K^{40} apare pe canalul 115.
- Se parcurge conturul fiecărui fotopic de pe monitor astfel că pe ecran vor apărea pe rând ariile ce interesează pentru calculul activităților;
- Se determină activitatea gamma a fondului în lipsa oricărei probe sau surse;
- Se determină ariile fotopicurilor și activitățile pentru sursele etalon; se lucrează cu același timp, relativ mare, pentru ridicarea spectrului pe ecran; în consecință valorile activităților surselor etalon se pot evalua înainte de momentul determinărilor efective; (dimensiunile surselor etalon sunt aceleași cu ale probelor, proba de Cesiu este încorporată în poliacrilamidă iar proba de potasiu este preparată dintr-o sare NH_4SO_4+KCl în care concentrația lui K_{40} este de 0,0118 %);
- Se calculează activitățile gamma pentru Cs^{137} și K^{40} la probele de depunere atmosferică și de vegetație folosind relațiile:

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\Lambda = \frac{(A_p - A_f)\Lambda_{et}}{A_{et} - A_f}$$

unde Λ_{et} este activitatea sursei etalon, A_f este aria fondului, A_{et} este aria fotopicului sursei etalon iar A_p este aria fotopicului probei.

TABEL CU DATE EXPERIMENTALE

proba	N_1	N_2	Q_1	Q_2	N	F	Λ_1	Λ_2	Obs.

ÎNTREBĂRI

1. Cum se explică radioactivitatea naturală?
2. Care sunt principalele surse de radioactivitate artificială?
3. Cum se pregătesc probele de aerosoli?
4. Cum se evalueaază radiactivitatea beta globală?
5. Cum se interpretează picurile obținute la spectrometru?

BCU ASE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

EVIDENȚIEREA INDIRECTĂ A EFECTELOR RADIAȚIILOR GAMMA ASUPRA UNOR MICROORGANISME

SCOPUL EXPERIMENTULUI

Punerea în evidență a efectelor stimulatoare ale dozelor mici de radiații asupra funcțiilor metabolice ale unor microorganisme.

MATERIALE ŞI DISPOZITIVE NECESARE

- Pentru observarea vizuală a efectelor stimulatoare ale dozelor mici de radiații asupra funcțiilor metabolice ale unor microorganisme este nevoie de preparate speciale, de forma culturilor de germeni test în prezența antibioticelor secretate de microorganisme tratate cu radiații.

Acestea se prezintă sub forma unor cutii Petri cu câte patru zone translucide discoidale pe fondul opac al creşterii neinhibate a germenului test.

- O riglă gradată transparentă este utilizată pentru evaluarea diametrelor zonelor de inhibiție a creşterii microbiene.
- Un program de calcul adecvat este utilizat pentru prelucrarea statistică a datelor.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Obținerea materialului biologic este rezultatul unor etape complexe de pregătire, cu durată de mai multe săptămâni sau chiar luni, care se pot realiza numai în condiții speciale, astfel că, în orele de aplicații practice ale studenților se va proceda numai la etapele finale, de citire și interpretare a datelor.

FENOMENOLOGIE

Se știe că, după etapa fizică și cea chimică a acțiunii radiațiilor ionizante asupra organismelor vii, se pot constata efectele biologice. Studii efectuate asupra unor culturi de celule tratate cu radiații ionizante au condus la rezultate a căror interpretare se poate face pe două direcții și anume, se poate vorbi de efecte ale radiațiilor *asupra funcțiilor celulare integrate* și de efecte ale radiațiilor *asupra unor funcții metabolice celulare*. Aceste funcții celulare metabolice sunt funcțiile de sinteză a acizilor nucleici și proteinelor, funcții care se realizează în principal prin reacții biochimice complexe. Radiațiile producând modificări ale vitezelor de reacție, efectele lor se pot evalua prin urmărirea cantitativă a principalilor produși de reacție: *ADN* , *ARN*, proteine dar și a unor produși secundari – metaboliți care sunt destinați eliminării din celulă.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1. Efectele radiațiilor asupra productivității unor microorganisme

Studii efectuate asupra unor populații de microorganisme, utilizate în diverse biotehnologii datorită tocmai unora dintre metaboliții excretați ca produși secundari ai unor reacții biochimice, au arătat că radiațiile pot conduce la modificarea cantităților de metaboliți eliminați de celule. Acești metaboliți pot fi aminoacizi, antibiotice etc. În cele ce urmează ne vom referi la antibiotice - produse de microorganisme de tipul actinomicetelor (specii de microorganisme considerate ca având atât caractere de ciuperci cât și de bacterii).

2. Principiul metodei de determinare a activutății microbiologice a unui antibiotic

În zonele mediului de cultură în care difuzează antibioticul, germenul test nu se mai poate dezvolta din cauza efectului nociv pe care această substanță o are asupra sa. Aceste zone apar ca niște discuri translucide pe un fundal opac, corespunzător creșterii germenului test în restul plăcii. Se amplasează câte două picături de soluție antibiotică provenită din cultura iradiată, în poziții diametral opuse și câte două picături de soluție antibiotică (preparate absolut identic) din cultura neiradiată.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

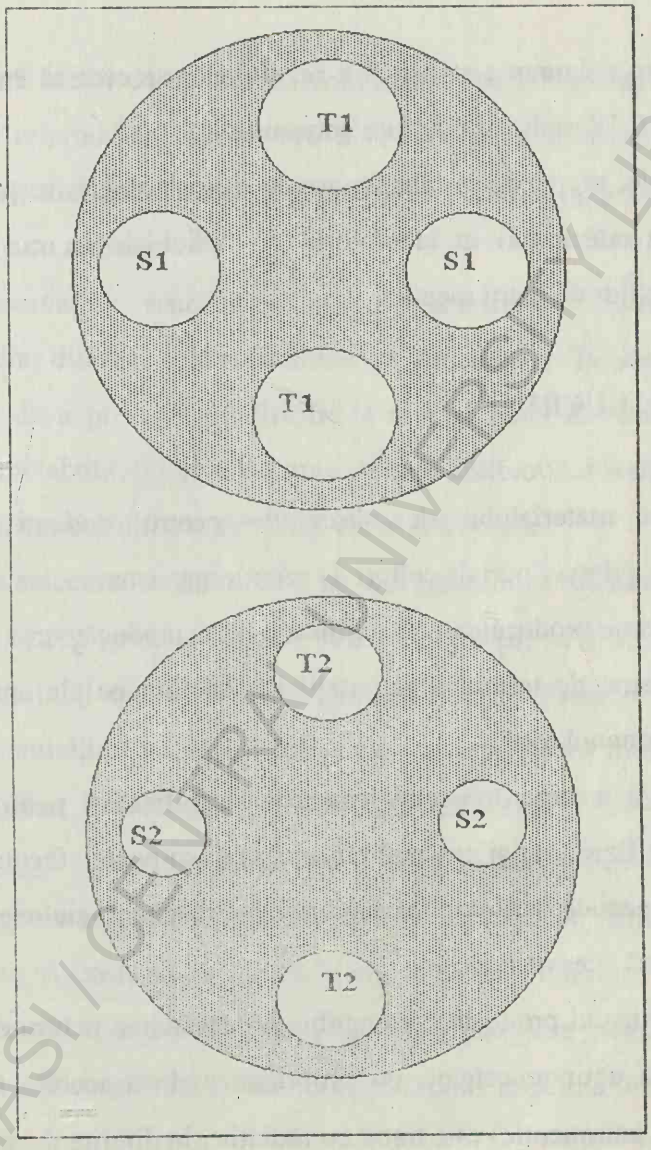
Aspectul plăcilor Petri inoculate cu germen test este caracteristic: zona cenuşie simbolizează creşterea culturii de microorganisme test, pe care s-au conturat zone discoidale de inhibiţie a creşterii (discuri albe). Pentru cele două concentraţii de lucru a soluţiei de antibiotic se obţin zone de diametre mai mari şi respectiv mai mici. Notaţia pentru antibioticul produs de cultura iradiată este T în timp ce pentru antibioticul produs de cultura standard este S. Cu indicii 1 şi 2 notăm prima şi respectiv cea de-a doua concentraţie de lucru de regulă aflate în raportul 1/2).

Zonele de inhibiţie a creşterii microbiene apar vizibile după 24 sau 48 de ore de menţinere a termostat la o temperatură de circa 35 sau 24 de grade Celsius (după cum este vorba de un microorganism de tipul bacteriilor sau ciupercilor).

Lucrul cu un germen nepatogen de tipul levurilor cum este drojdia de bere (*Saccharomyces cerevisiae*) permite testarea unui antimicotic cum este stamicina.

Protocolul de interpretare a datelor din normele farmaceutice impune lucrul cu două concentraţii diferite de soluţie de antimicotic, de regulă în raportul 1/2. Deci vor exista două tipuri de plăci Petri: cele pentru concentraţia mai mică, corespunzătoare zonelor translucide mai mici şi cele pentru concentraţia mai mare, corespunzătoare zonelor translucide mai mari.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Aspectul caracteristic al plăcilor cu germeni test dezvoltați în prezența substanțelor antibacteriene (sau antifungice)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pentru asigurarea statistică a rezultatelor se cere să se lucreze cu serii de câte 6-18 replici din fiecare concentrație.

Plăcile, preparate în laboratoare de microbiologie, se pot aduce ca atare pentru măsurători în laboratorul de radiobiologie, cu respectarea strictă a regulilor de lucru aseptic.

MODUL DE LUCRU

- Obținerea materialului de observație pentru studenți presupune utilizarea a două tipuri de culturi de microorganisme:

-microorganisme producătoare de antibiotic (suşa producătoare);

-microorganisme de testare a activității antimicrobiene aie antibioticului respectiv (germenul test).

- Prima fază a experimentului, cea mai semnificativă pentru acțiunea factorului fizic este şi cea mai laborioasă şi se poate efectua numai în condiții speciale care implică facilități de biotehnologie adecvate. Iată în ce constă această fază.

a. Microorganismul producător de antibiotic selecționat pentru experiment (din categoria actinomicetelor, cu proprietatea de a secreta un anumit antibiotic sau antimicotic) este tratat cu radiații γ în diferite doze pentru a i se induce modificări metabolice convenabile.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Sunt necesare medii de cultură cu compoziție specială pentru a întreține culturile de microorganisme, pentru a le multiplica în vederea selecției coloniilor celè mai dezvolate ca şi pentru conservarea lor până la momentul tratamentului cu radiații.

b. Din observațiile sistematice asupra caracterelor morfologice ale coloniilor din diferite culturi iradiate se procedează la alegerea celor susceptibile de a prezenta modificări la nivelul funcțiilor metabolice de secretare a metabolitului ce constituie de fapt antibioticul urmărit. Aceste etape pot dura mai multe săptămâni şi chiar luni de zile.

c. Coloniile selectate se multiplică iar din mediile de cultură în care se dezvoltă se extrag (prin cascade de filtrări, extracții, solviri, recristalizări etc.) mici cantități din antibioticul produs. Este necesară o foarte bună evaluare a cantităților inițiale şi finale care caracterizează întregul lanț de reacții şi procese. Aceste etape pot dura mai multe zile.

- A doua fază constă în compararea eficacității antibioticului produs de microorganismele iradiate cu a celui produs de micoorganisme neiradiate. Aceasta se realizează în laborator, prin intermediul unor alte specii de microorganisme, de tipul celor patogene pentru om, care urmează a fi combătute cu antibioticul produs în prima fază –germenii test.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

a. Pentru experimente demonstrative se poate alege o specie de microorganisme care să fie sensibile la antibioticul testat dar să fie cât mai puțin periculoase pentru om, pentru a putea fi manipulate și în spații neprevăzute cu condiții de sterilitate sau semisterilitate.

b. Se prepară plăci Petri cu medii de cultură pentru germenul test (medii agarizate care solidifică la temperatura camerei) și se inoculează, în proporții bine stabilite (conform standardelor farmaceutice), cu cantități corespunzătoare din germenul test.

c. Pe câte o astfel de placă se adaugă soluția din antibioticul analizat (cel produs de microorganismul iradiat) și cel etalon (produs de același microorganism neiradiat).

d. Soluțiile se prepară după normativele farmaceutice (de exemplu Farmacopeia Română sau U.S Pharmacopeia) disponibile și reprezintă, în final, soluții apoase de antibiotic care difuzează izotrop în mediile de cultură din cutiile Petri. Aceste etape durează circa 3 zile.

Se citesc diametrele zonelor de inhibiție a creșterii germenului test și se tabelează.

Se evaluează *activitatea microbiologică* a antibioticului produs de microorganismele iradiate cu radiații γ relativ la activitatea antibioticului produs de actinomicete neexpuse la radiații.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

TABEL CU DATE EXPERIMENTALE

Nr. crt.	S1(mm)	S2(mm)	T1(mm)	T2(mm)

S1-diametrul zonei de inhibiţie a germenului test, corespunzătoare concentraţiei mari de antibiotic provenit din microorganism producător neiradiat

S2-diametrul zonei de inhibiţie a germenului test, corespunzătoare concentraţiei mici de antibiotic provenit din microorganism producător neiradiat

T1- diametrul zonei de inhibiţie a germenului test, corespunzătoare concentraţiei mari de antibiotic provenit din microorganism producător iradiat

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

T2- diametrul zonei de inhibiție a germenului test, corespunzătoare concentrației mici de antibiotic provenit din microorganism producător iradiat.

Se observă diferențele care apar între valorile medii ale diametrelor T şi S la fiecare concentrație de lucru. Deşi de ordinul a numai 0,5-1 mm, aceste diferențe sunt în favoarea zonelor de tip T reflectând îmbunătățirea productivității microorganismului după iradiere (activitate microbiologică crescută - zone de inhibiție a creşterii germenului test mai mari).

ÎNTREBĂRI

1. Ce funcții celulare pot fi afectate de radiațiile ionizante ce acționează asupra microorganismelor?

2. Cum se explică diferența de transparență a plăcilor de cultură a germenilor test după inoculare de antibiotic?

3. Difuzia soluției de antibiotic în mediul de cultură a germenului test este izotropă sau anizotropă? De unde rezultă aceasta?

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ANEXĂ

Evaluarea activităţii microbiologice a unui produs de biositeză obţinut din microorganisme producătoare iradiate sau neiradiate

Programul de mai jos calculează activitatea microbiologică a substanţei testate pe baza unui algoritm care permite compararea activităţii necunoscute a probei testate (T) cu cea a unei probe etalon (standard, S).

Cu ajutorul său se evaluează activitatea unui produs al microorganismelor neiradiate precum şi un produs al microorganismelor iradiate.

Valorile diametrului zonei de inhibiţie sunt notate cu S1 şi T1 (pentru prima diluţie) respectiv S2 şi T2 (pentru a doua diluţei de lucru). Există şase plăci Petri de lucru, indexate de I.

S1M, S2M, T1M,T2M şi DS1M, DS2M, DT1M, DT2M sunt valori medii ale datelor şi respectiv ale abaterilor lor (deviaţiile standard) faţă de valorile medii. Calculul statistic prevede câţiva parametri de control, cum sunt E,F,V, B,H, G, ultimii doi invalidând determinarea experimentală dacă datele sunt prea împrăştiate.

Program de calcul

```
10 DIM S1(6), S2(6), T1(6), T2(6), DS1(6), DS2(6), DT1(6), DT2(6),
20 FOR I=1 TO 6
30 Print "I="; I:Input "S1=";S1(I):Input ":S2=";S2(I):
```


BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

```
35 Input "T1=";T1(I):Input"T2=";T2(I)
40 Next I
50 Input "IP=";T1(I):Input"U=";U
51 Lprint "date"
52 For I=1 TO 6
53 Lprint "I=";I,"S1=";S1(I),"S2(I),"T1=";T1(I),"T2=";T2(I)
54 Next I
55 Lprint
56 Lprint"IP=";IP."U=";U
57 Lprint
58 Lprint "rezultate"
60 S1M=(S1(1)+S1(2)+S1(3)+S1(4)+S1(5)+S1(6))/6
70 S2M=(S2(1)+S2(2)+S2(3)+S2(4)+S2(5)+S2(6))/6
80 T1M=(T1(1)+T1(2)+T1(3)+T1(4)+T1(5)+T1(6))/6
90 T2M=(T2(1)+T2(2)+T2(3)+T2(4)+T2(5)+T2(6))/6
100 FOR I=1 TO 6
110 DS1(I)=(S1(I)-S1M)^2
120 DS2(I)=(S2(I)-S2M)^2
130 DT1=(T1(1)-T1M)^2
140 DT2=(T2(1)-T2M)^2
150 Next I
```


BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

```
160 DS1M=(DS1(1)+DS1(2)+DS1(3)+DS1(4)+DS1(5)+DS1(6))/6
170 DS2M=(DS2(1)+DS2(2)+DS2(3)+DS2(4)+DS2(5)+DS2(6))/6
180 DT1M=(DT1(1)+DT1(2)+DT1(3)+DT1(4)+DT1(5)+DT1(6))/6
190 DT2M=(DT2(1)+DT2(2)+DT2(3)+DT2(4)+DT2(5)+DT2(6))/6
200 E=(T2M-T1M+S2M-S1M)/2:F=(T1M+T2M-S1M-S2M)/2
210 BO=E/0.301:MO=F/BO:R=10^MO
220 RO=IP*R:SS=(DS1M+DS2M+DT1M+DT2M)/20
230 V=SS/6:A=V/0.0906
240 G=4.3681*B/(BO^2)
245 If G>0.1 goto 800
250 If H>2.09 goto 800
260 H=(T2M-T1M-S2M+S1M)/(2*SQR(V))
280 K1=2+(2.09*SQR (A+B*MO*MO))/BO
290 K2=2-(2.09*SQR (A+B*MO*MO))/BO
300 L1=10^K1
310 L2=10^K2
320 R1=RO*L1/100
330 R2=RO*L2/100
340 RU=100*RO/(100-u)
350 RU1=100*R2/(100-u)
360 RU2=100*R2/(100-u)
```


BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

```
370 Print "S1M=";S1M, "S2M=";S2M,"T1M=";T1M;"T2M=";T2M
380 Print "SDS1M=";DS1M,
"DS2M=";DS2M,"DT1M=";DT1M;"DT2M=";DT2M
390 Print "R=";,"RO=";RO,"G=";G,"H=";H
400 Print "L1=";L1,"L2=";L2'"RU1=";RU1,"RU2=";RU2
401 Lprint "S1M=";S1M,"S2M=";S2M,T1M=";T1M'"T2M=";T2M
402 Lprint
"DS1M=";DS1M,"DS2M=";DS2M,DT1M=";DT1M,"DT2M=";DT2M
403 Lprint "R=";R,"RO=";RO,"H=";H,"G=";G
404 Lprint "LU1=";LU1,"LU2=";LU2,"RU1=";RU1,"RU2=";RU2
410 End
800 Print "Invalid*G"
805 Lprint "Invalid*G"
900 Print "Invalid*H"
905 Lprint "Invalid*H".
910 Goto 200
```

Iată un exemplu numeric în care IP=1500 i.u. iar u=0.9.

IP este activitatea microbiologică ipotetică a substanței testate față de care se evaluează activitatea reală (conform algoritmilor de calcul prevăzuți de normativele de specialitate). Ea se exprimă în unități internaționale (i.u.), definite de aceleași normative pentru fiecare substanță în parte.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cu *u* se notează conținutul de umiditate al substanței testate (evaluat prin măsurători corespunzătoare).

Date	cm	cm	cm	cm
I=1	S1=28	S2=25	T1=28.5	T2=25
I=2	S1=28	S2=25	T1=28	T2=25
I=3	S1=28	S2=25	T1=28	T2=25
I=4	S1=28	S2=25	T1=28	T2=25
I=5	S1=28	S2=25	T1=28	T2=25
I=6	S1=28	S2=25	T1=28	T2=25

Rezultate				
S1M=28	S2M=25	T1M=28	T2M=25	
DS1M=0	DS2M=0	DT1M=0.0334		DT2M=0
R=0.995885	RO=1523.7	G=1.36616E-04	RU=1537.53	H=-2.44951
L1=99.1931	L2=100.813	RU1=1525.14	RU2=1550.05	

L1 şi L2 sunt limitele procentuale impuse de normativele de calitate a medicamentelor, iar RO este activitatea microbiologică înainte de aplicarea corecției impuse de conținutul de umiditate (raportarea la substanța uscată). După această corecție valoarea devine RU şi limitele

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

sale de variaţie sunt RU1 şi RU2.

În exemplul dat RU=1537.53 iar RU1 şi RU2 sunt respectiv 1525.14 şi 1550.05.

Evident că proba testată este mai eficientă (cu activitate mai mare) decât substanţa etalon deoarece una din cele şase plăci Petri de la prima diluţie are diametrul mai mare (T1=28.5cm faţă de S1=28 cm) în raport cu cel al etalonului.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Bibliografie selectivă

1. Artenie, V., Tanase, A., Practicum de biochimie, Ed. Univ. Al. I. Cuza, Iaşi, 1981
2. Anderson, D.W., Absorption of ionizing radiation,University Park Press, Baltimore, 1983
3. Coggle, J.E., Radiobiology, Taylor & Francis Ltd., London, 1983
4. Curry, T.S., Downday, J.E., Murry, R.S. jr., Physics of diagnostic radiology, Ed. Univ. Patras, 1995
5. Dimoftache, C., Herman, S., Biofizică medicală, Ed. Cerma, Bucureşti, 1993
6. Dumitrescu, Fl., Electronografia, Ed. tehnică, Bucureşti, 1980
7. Gheorghe V., Popescu A., Introducere în bionică, Ed. Ştiinţifică, Bucureşti, 1990
8. Grémy, F., Perrin, J., Éléments de biophysique, ed. Flammarion, Paris, 1975
9. Horrocks, J.A., Speller, R.D., Interaction of radiation with matter, Univ. Patras, 1995
10. Isac, M., Biofizica, Ed. Univ. Al. I. Cuza, Iaşi, 1988
11. Mihăilescu, D., Dozimetria radiaţiilor ionizante, Ed. Univ. al. I. Cuza, Iaşi, 2001
12. Moraru, O., Lascu, V., Electricitatea atmosferică şi organismul uman, Ed.Dacia, Cluj-Napoca, 1981

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

13. Nicolae, I., Nasta, A., Radiogenetica, E.S.E., 1975
14. Nicolau, C., Simon, Z., Biofizica moleculară, Ed. Şt ., Bucureşti, 1968
15. Radiobiologia, Pop T., (ed.), Ed. Ştiinţifică, Bucureşti, 1970
16. Rosetti-Colţoiu, M., Mitrea, N., Biochimie, Ed. did. şi ped., Bucureşti, 1985
17. Rush, K., Fulton, J., Fiziologie medicală şi biofizică, Ed. Medicală, Bucureşti, 1970
18. Rusu, V., Baran, T., Brănişteanu, D.D., Biomembrane şi patologie, Ed. Medicală, 1988
19. Ştirban, M., Fotosinteza, Ed. did şi ped., Bucureşti, 1979
20. Strat, M. Spulber, V., Introducere în spectroscopia mediilor condensate, Ed. Tehnică, Buucreşti, 1981
21. Tamaş, V., Neamţu, G., Pigmenţi carotenoidici şi metaboliţi, vol.1, Ed. Ceres, Bucureşti, 1986
22. Tubiana, M., Dutreix, J., Wambersie, A., Introduction to radiobiology, Taylor & Francis Ltd., London, 1990
23. Vasilescu, V., Biofizica medicală, Ed. Did. şi Ped., Bucureşti, 1977
24. Vlădescu, C., Găleşanu, M.R., Urseanu, I., Radiosensibilizatori în terapia oncologică, Ed. Junimea, Iaşi, 1991

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cuprins

Experimentul 1. Influenţa radiaţiilor gamma de intensitate mică asupra creşterii plantelor 1

Experimentul 2. Efectele indirecte ale radiaţiilor asupra dezvoltării gramineelor 9

Experimentul 3. Studiul aberaţiilor cromosomiale induse de radiaţii 25

Experimentul 4. Trasarea curbei de supravieţuire în cazul microorganismelor expuse la radiaţii 42

Experimentul 5. Efectul radiaţiilor gamma asupra vâscozităţii unor suspensii coloidale 56

Experimentul 6. Studiul efectelor de excitare şi ionizare de la interacţiunea unei descărcări electrice de tip Corona cu probe vii şi inerte. *Studiul calitativ al imaginilor electronografice, cu aplicaţii medicale* 77

Experimentul 7. Studiul efectelor de excitare şi ionizare de la interacţiunea unei descărcări electrice de tip Corona cu probe vii şi inerte. *Studiul efectelor descărcării corona asupra plantulelor de graminee* 96

Experimentul 8. Efectele radiaţiilor ultraviolete asupra unor lichide biologice 99

Experimentul 9. Influenţa radiaţiilor asupra tensiunii superficiale a serului sangvin 110

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Experimentul 10. Modificarea activității enzimatice sub acțiunea radiațiilor ionizante 121

Experimentul 11. Acizii nucleici și radiațiile ionizante 132

Experimentul 12. Determinarea nivelului radioactivității din componentele biotice și abiotice ale mediului înconjurător 142

Experimentul 13. Evidențierea indirectă a efectelor radiațiilor γ asupra unor microorganisme 156

Bibliografie 172

Cuprins 174

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI
FIZICĂ

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

TIPARUL EXECUTAT LA
IMPRIMERIA EDITURII UNIVERSITĂȚII
„ALEXANDRU IOAN CUZA" DIN IAȘI
6600 Iași, Păcurari 9, tel./fax (0232) 314 947
e-mail: editura_uaic@mail.com

Format: 70×100/16
Coli tipo: 11,25
Apărut: 2003
Comanda: 1.402

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY